



Ana Isabel Duarte
André

Ensaio de *bait-lamina* em comunidades edáficas de
uma área mineira



**Ana Isabel Duarte
André**

**Ensaio de *bait-lamina* em comunidades edáficas de
uma área mineira**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia e Ecotoxicologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira, Investigadora Auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Universidade de Aveiro, e co-orientação científica da Doutora Sara Cristina Ferreira Marques Antunes, Investigadora de Pós-doutoramento do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

Trabalho realizado no âmbito dos
projectos POCI e
PPCDT/AMB/60899/2004,
financiados pela FCT e pelo Programa
Operacional Ciência e Inovação 2010
(POCI 2010) participado pelo fundo
comunitário Europeu FEDER

o júri

presidente

Prof. Doutor António José Arsénia Nogueira

professor associado com agregação, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Fernando José Mendes Gonçalves

professor associado com agregação, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor José Paulo Filipe Afonso de Sousa

professor auxiliar, Departamento de Zoologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira (Orientadora)

investigadora auxiliar do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) da Universidade de Aveiro

Doutora Sara Cristina Ferreira Marques Antunes (Co-orientadora)

investigadora de pós-doutoramento do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

A realização deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração e encorajamento de algumas pessoas, às quais gostaria de agradecer.

À Doutra Ruth Pereira e à Doutora Sara Antunes, minha orientadora e co-orientadora, respectivamente, por terem aceite esta responsabilidade e pelas sugestões, críticas e revisões desta dissertação bem como pelo apoio que me deram nas saídas de campo.

Ao Doutor Fernando Gonçalves por, uma vez mais, me ter permitido fazer parte da sua equipa, por todo o apoio e conselhos que tem dado, assim como pela preciosa ajuda nas saídas de campo.

A toda a equipa do laboratório LEAD pelo seu companheirismo, amizade e disponibilidade para ajudar sempre que necessário.

Aos meus amigos, mais do que colegas, Carmen, Ana Cuco, Vanessa, Luísa... pela sua amizade e apoio.

À minha família por todas as oportunidades que me proporcionaram e que me permitiram chegar aqui, por todo apoio e carinho.

palavras-chave

mina de urânio abandonada, análise de risco ecológico, ensaio de *bait-lamina*, actividade alimentar da comunidade edáfica

resumo

O ensaio de *bait-lamina*, desenvolvido por Von Törne (1990) permite avaliar a actividade alimentar da comunidade edáfica e inferir sobre potenciais impactos da contaminação de solos, neste parâmetro. É um ensaio de rastreio ecológico recomendado para aplicar na etapa 2 da análise de risco ecológico (ARE) de locais contaminados.

No âmbito da ARE em curso para a área da mina de urânio da Cunha Baixa (Mangualde, Centro de Portugal), o presente trabalho teve como objectivo avaliar *in situ* os efeitos da contaminação por metais, na actividade alimentar da comunidade edáfica usando o ensaio de *bait-lamina*. Para atingir este objectivo geral foram definidos os seguintes objectivos específicos: a) avaliar o tempo de exposição necessário para discriminar locais com diferentes níveis de contaminação; b) perceber o efeito da sazonalidade na avaliação da actividade alimentar e na distinção de locais com diferentes níveis de contaminação e, c) avaliar a existência de um gradiente vertical, nos efeitos da contaminação, na actividade alimentar e na subsequente degradação de matéria orgânica. Os dados ecológicos obtidos com este estudo visam complementar a caracterização química e ecotoxicológica de solos contaminados, já efectuada para esta área mineira.

Com base nos resultados obtidos, para os dois períodos de exposição testados, verificou-se que é necessário um período mínimo de 14 dias para avaliar a actividade alimentar da comunidade edáfica. Este tempo de exposição permitiu distinguir locais com diferentes níveis de contaminação e concluir ainda que existe uma forte influência da sazonalidade na actividade dos organismos edáficos, o que pode conduzir a interpretações diferentes das respostas registadas, consoante a estação do ano em que o ensaio seja efectuado. Assim, os solos (B, D, e G) que apresentaram um nível superior de contaminação por metais foram também aqueles para os quais se registaram baixas percentagens de actividade alimentar em todas as estações do ano. Em relação à análise em profundidade, apenas se registaram diferenças significativas entre os dois níveis de profundidade considerados (N1 e N2), nas *bait-lamina*, na Primavera. Contudo, foi possível distinguir diferenças entre locais, nesta mesma estação, quando a análise das percentagens teve em conta os dois níveis de profundidade das *bait-lamina*. De uma forma geral, as percentagens médias de actividade foram superiores nos 4cm superficiais do solo. Diferenças na estrutura do solo, que podem ser altamente significativas em solos afectados pela actividade mineira, poderão explicar este perfil de actividade alimentar. O ensaio de *bait-lamina*, quando realizado *in situ* é bastante sensível aos factores ambientais (ex. temperatura, humidade e matéria orgânica), alguns dos quais podem inclusivamente mascarar a resposta de contaminantes, pelo que uma vasta gama de propriedades do solo deve ser determinada em paralelo à realização do ensaio.

keywords

abandoned uranium mine, ecological risk assessment, bait-lamina assay, feeding activity of the edaphic community

abstract

The bait-lamina assay, developed by Von Törne (1990), allows to assess the feeding activity of the edaphic community (soil invertebrates) and to infer about the potential impacts of soil contamination on this parameter and subsequently on organic matter decomposition. Thus, this assay has been recommend for the tier 2 of the site-specific risk assessment (ERA) processes.

As part of ERA, which has been carried out in the Cunha Baixa uranium mine area (Mangualde, Centre of Portugal), the aim of the present work was to perform an *in situ* assessment of the effects of metals on the feeding activity of edaphic community, using the bait-lamina assay. To achieve this general goal specific objectives were defined: a) to evaluate the best exposure period to discriminate sites with different levels of contamination; b) to understand seasonal influence on the feeding activity of soil invertebrates; and, c) to evaluate the existence of a vertical gradient, in the effects of contamination on the feeding activity and subsequently in organic matter decomposition. The ecological data obtained in this study aimed to complement the chemical and toxicological characterization of contaminated soils already done, in previous studies, for this mining area.

Fourteen days of exposure, were considered the most appropriate exposure period to assess the feeding activity of edaphic community. This period of exposure of bait-lamina in the field allowed a discrimination of study sites based on different levels of contamination. A strong influence of seasonality was recorded which may lead to a misleading interpretation of the responses if the bait-lamina assays is not repeated in the different seasons. In this way, soils (B, D and G), which showed the highest pseudo-total metal concentrations were those which had the lowest percentages of feeding activity, as well, in all seasons of the year. As far as depth was considered significant differences, between the two levels defined in the bait-lamina (N1-upper 4 cm; N2-inferior 4cm), were recorded only in Spring. Moreover, this analysis allowed discriminating sites in this season. In a general way, the average percentage of soil invertebrates feeding activity was high in the first 4 cm of the soil. Bait-lamina is very sensitive to environmental factors (eg. Temperature, moisture and organic matter) when performed *in situ*. Some of these environmental factors can even mask the effects of contaminants, so a vast array of soil properties should be measured in parallel with this assay.

ÍNDICE

	Pág.
INTRODUÇÃO	1
• Estrutura da dissertação e objectivos do estudo	10
MATERIAL E MÉTODOS	12
• Descrição do local de estudo	12
• Ensaio de <i>bait-lamina</i>	12
• Determinação dos parâmetros físico-químicos do solo	15
• Concentração pseudo-total de metais	16
• Análise estatística	16
RESULTADOS	18
DISCUSSÃO	29
CONCLUSÕES	34
BIBLIOGRAFIA	36

INTRODUÇÃO

O solo é um sistema dinâmico e complexo, sendo considerado o principal componente do ecossistema terrestre (Alloway, 1995). Do ponto de vista ecológico é vital para o bom desempenho de uma variedade de funções essenciais, nomeadamente: i) funciona como *habitat* para diversos microrganismos, animais, plantas e para o próprio Homem; ii) desempenha funções importantes na degradação e/ou reciclagem activa de nutrientes e na decomposição de resíduos orgânicos; iii) modela e tamponiza o ciclo hidrológico através da retenção da água da chuva libertando-a de forma progressiva para as linhas de água; iv) protege as águas superficiais e subterrâneas do derramamento de contaminantes atenuando o movimento destes por escorrência e/ou infiltração, através de processos de absorção e adsorção; v) é uma fonte natural de fibra e alimento e, vi) suporta infra-estruturas e todas as actividades antropogénicas (Van Straalen e Van Gestel, 1993; Alloway, 1995; Nason et al., 2003; Beck et al., 2005; Römbke et al., 2005; O'Halloran, 2006).

O solo abarca uma enorme diversidade de organismos e classifica-se como um dos compartimentos mais ricos em espécies da biosfera (Ekschmitt e Griffiths 1998; Ruiter et al., 2002), sendo por isso considerado um sistema dinâmico (Fairbridge e Finkl, 1979). Segundo uma perspectiva ecológica, e no que diz respeito às comunidades do solo, pode ser feita uma distinção entre a sua estrutura e os seus atributos funcionais. A sua estrutura inclui todas as populações de espécies, a sua abundância relativa e a forma como se interrelacionam, o que se avalia com base em diversos parâmetros passíveis de serem mensurados (ex. diversidade, biomassa, abundância, riqueza em espécies, grupos funcionais e alimentares). O aspecto funcional inclui, entre outros, taxas de decomposição de matéria orgânica, de degradação de substratos, de respiração e nitrificação (Van Straalen, 2002). Consoante as características de um ecossistema, este pode albergar diferentes comunidades edáficas, compostas por populações de predadores, decompositores, bactérias simbiotes, patogénicos e parasitas (Wentzel et al., 2003), que diferem em tamanho, número, *nicho ecológico*, ciclo de vida, fonte de alimento, distribuição e interacção (Wentzel et al., 2003). A actividade e as interacções dos organismos que fazem parte dessas populações são responsáveis pelos processos ecológicos do solo, especialmente pela decomposição da matéria orgânica e do ciclo de nutrientes (Bardgett e Chan, 1999; Ruiter et al., 2002). Os organismos edáficos são

também responsáveis por outros processos como a degradação ou imobilização de determinados contaminantes; a drenagem e arejamento dos solos e a estabilização de agregados do solo, através da construção de complexos de argila e húmus (Peijnenburg, 2002; Beck et al., 2005). Em suma, fornecem as condições necessárias à manutenção da qualidade, fertilidade e estrutura do solo, aspectos essenciais para a protecção e manutenção da dinâmica de todo o ecossistema terrestre e da sua biodiversidade (Wentzel et al., 2003; Römcke e Breure, 2005).

O solo quando contaminado é normalmente caracterizado pela presença de uma mistura complexa de agentes químicos (Haimi, 2000). A contaminação dos solos é considerada um dos principais problemas ambientais dos nossos tempos, sendo que pode ter inúmeras consequências, realçando-se as seguintes:

- a contaminação de águas subterrâneas e superficiais, dado que a capacidade do solo em reter contaminantes é afectada (Gupta et al., 1996);
- a transferência de contaminantes às cadeias alimentares através da sua bioacumulação em produtores primários, ou da ingestão directa de solo por alguns animais (Haimi 2000; Loureiro, 2004; O'Halloran, 2006);
- alterações de funções essenciais do ecossistema edáfico, como é o caso da decomposição de matéria orgânica e reciclagem de nutrientes pelos organismos do solo, nomeadamente microrganismos e invertebrados (Gupta et al., 1996; CSTEE, 2000; Edwards, 2002; Haimi e Mätäsniemi, 2002; Wentzel et al., 2003; Peplow e Edmonds, 2005);
- alterações na abundância, diversidade e actividade de organismos do solo (Wentzel et al., 2003; Beck et al., 2005; Peplow e Edmonds, 2005);
- perturbações na capacidade do solo em actuar como substrato para plantas (CSTEE, 2000), ou seja na função de produção de biomassa vegetal.

Diversas actividades antropogénicas contribuem para a contaminação do solo, como é o exemplo da exploração de minérios metálicos. A exploração mineira é uma actividade essencial para vários sectores da economia, aos quais fornece diversas matérias primas, no entanto acarreta bastantes problemas ambientais, não só durante a actividade de exploração mas também após o fim da mesma, com produção de efluentes ácidos ricos em metais (Marques et al., 2007). Após a cessação da exploração, o impacto negativo no local de

exploração e nas áreas circundantes geralmente persiste (Neves et al., 1997; Oliveira, 1997; Oliveira e Ávila, 2001; Nero et al., 2003). Grandes quantidades de resíduos, compostos por materiais geológicos ricos em elementos químicos e radioactivos perigosos, foram produzidos e depositados nas proximidades dos locais de exploração, promovendo a transferência desses elementos para diferentes compartimentos adjacentes (solo, água subterrâneas, linhas de água, ar). Estes compartimentos sofrem deste modo efeitos colaterais devido ao facto de ficarem expostos a elevadas concentrações de contaminantes, nomeadamente metais (Oliveira e Ávila, 1998; Pedrosa e Martins, 1999; Pereira et al., 2004b; Antunes et al., 2007; Pereira et al., 2008). No entanto, o solo é o compartimento ambiental afectado de forma mais directa, sofrendo severas alterações na sua estrutura e função (Pereira et al., 2006).

Os metais pesados são os contaminantes mais comuns em áreas de exploração de minério sendo os depósitos de escórias e resíduos de rocha, que são depositados nas proximidades destes locais, as maiores fontes destes elementos (Salomons, 1995; Pereira et al., 2004a). Quando esses depósitos contêm sulfuretos (pirite) o contacto com o ar atmosférico, pode promover a formação de drenagens ácidas (Salomons, 1995; Pedrosa e Martins, 1999), com níveis elevados de metais, contribuindo deste modo para a sua mobilização no ambiente. Uma vez introduzidos no ambiente, os metais pesados, passam por uma série de processos biológicos e químicos que conduzem à sua distribuição nos diferentes compartimentos ambientais (nomeadamente no solo, sedimento, água, ar e biota) (Salomons, 1995; Khalil et al., 2008).

As minas de urânio, em particular, dão origem a resíduos que, além das elevadas concentrações de diversos metais, apresentam material radioactivo (Lozano et al., 2000; 2002; Vandenhove et al., 2007). A exploração de minério radioactivo em Portugal começou em 1907 (Batista et al., 2005; Neves et al., 2005) quando se deu início à exploração de rádio. De 1944 a 2000 centrou-se na produção de urânio (Neves et al., 2005), tendo-se desenvolvido sobretudo na região Centro mas também no Alentejo e no Norte do País (Figura 1) (Nero et al., 2003). A exploração de minério radioactivo levou à produção de cerca de 4370 toneladas de U_3O_8 , sais de rádio e cerca de 13 milhões de toneladas de diferentes resíduos (Nero et al., 2003; Neves et al., 2005). Os métodos usados na extracção destes minérios foram a exploração a céu aberto e a lavra subterrânea (Carvalho et al., 2005). Na tentativa de maximizar a recuperação de urânio de minério

pobre foi utilizado, em determinados locais, o processo de lixiviação estática *in situ* (Nero et al., 2003).

A mina de urânio da Cunha Baixa foi considerada uma das explorações mais importantes da região Uranífera Portuguesa (Pedrosa e Martins, 1999), tendo sido classificada recentemente como uma área de intervenção prioritária (Oliveira, 1997; Decreto-Lei nº.198-A/2001). Esta classificação resultou fundamentalmente de estudos que revelaram a contaminação de águas superficiais e subterrâneas, e de solos agrícolas adjacentes à área mineira, com concentrações elevadas de metais e de radionuclídeos de urânio, assim como a exposição dos seres humanos a elevados níveis de radiação (Neves et al., 1997; Machado, 1998; Pedrosa e Martins, 1999; Nero et al., 2003; Falcão et al., 2004). Estudos levados a cabo na área da exploração têm também revelado elevados valores de metais nos solos, da área mineira e de áreas adjacentes resultantes primordialmente da deposição de escórias da mina e de lamas resultantes do tratamento químico do efluente (Oliveira e Ávila, 1998; Antunes et al., 2008; Pereira et al., 2008). A contaminação destes solos por metais também poderá estar a afectar as suas comunidades. Antunes et al., 2008 e Niemeyer et al. (submetido) verificaram que a contaminação destes solos por metais é responsável por efeitos ecotoxicológicos sub-letais em *Eisenia andrei* e *Enchytraeus crypticus*.



Figura 1- Distribuição das zonas de exploração de urânio em Portugal (adaptado de Antunes, 2007).

Uma vez identificada a complexidade da contaminação provocada pela exploração de minérios, no ambiente terrestre, é necessário desenvolver medidas para proceder à caracterização e avaliação dos riscos. A análise de risco ecológico (ARE) é uma ferramenta recomendada para locais com contaminação ambiental identificada, sendo que a sua aplicação a zonas de exploração mineira se encontra amplamente documentada (Lozano et al., 2000; Laurence, 2001; Pereira et al., 2004a; Weeks et al., 2004; Weeks e Comber, 2005; Faber, 2006; Jensen e Mesman, 2006; O'Halloran, 2006; Mattson e Angermeier, 2007; Pereira et al., 2008). A ARE é já utilizada em diversos países (ex. Canadá, USA, Holanda, Reino Unido), alguns dos quais desenvolveram esquemas conceptuais que têm por base uma sequência de etapas que culminam na caracterização e comunicação dos riscos (Weeks et al., 2004; Weeks e Comber, 2005; Jensen e Mesman, 2006; O'Halloran, 2006).

A análise de risco ecológico consiste num processo de recolha, organização e análise de dados para estimar riscos associados à contaminação de ecossistemas, suportando deste

modo tomadas de decisão relativas à gestão do risco (Weeks et al., 2004; Weeks e Comber, 2005; Jensen e Mesman, 2006; Semenzin, et al., 2008). A ARE desenvolve-se ao longo de uma sequência de etapas que se baseia numa abordagem em tríade que combina três linhas de evidência (LE): a química, a (eco)toxicológica e a ecológica (Van Straalen, 2002; Jensen e Mesman, 2006; Critto et al., 2007; Semenzin et al., 2007; Semenzin et al., 2008). A informação obtida na tríade, resultante da combinação dos dados obtidos nas três linhas, permite prosseguir, na análise de risco, para etapas subsequentes ou parar assim que se obtenha uma resposta satisfatória com um nível de incerteza aceitável (Van Straalen, 2002; Critton et al., 2007; Semenzin et al., 2008). A combinação dos resultados das três linhas de evidência é a forma mais fiável, uma vez que apenas assim temos uma avaliação integrada e realista dos efeitos globais dos contaminantes nos ecossistemas. O esforço associado à avaliação dos resultados das três linhas de evidência independentes fornece uma diminuição pragmática das incertezas, associadas à análise de risco, permitindo estabelecer uma ligação causal entre o contaminante e a resposta ecológica adversa (McMillen et al., 2003; Weeks et al., 2004; Weeks e Comber, 2005; Jensen e Mesman, 2006; Critto et al., 2007).

A linha de evidência *química* consiste na determinação das concentrações dos contaminantes no ambiente (totais e biodisponíveis) e da sua bioacumulação, as quais são usadas para calcular e caracterizar o risco, por comparação com dados de toxicidade recolhidos na bibliografia, ou com valores de referência já calculados para os contaminantes em causa (Long e Chapman, 1985 citado por Semenzin et al., 2007; Chapman, 1990 citado por Semenzin et al., 2008; Jensen e Mesman, 2006).

A linha de evidência *(eco)toxicológica* consiste na obtenção de dados ecotoxicológicos para as matrizes contaminadas (solos) através da realização de ensaios em laboratório e/ou *in situ*, usando espécies padrão ou autóctones (Van Straalen, 2002; Weeks et al., 2004; Jensen e Mesman, 2006).

A linha de evidência *ecológica* consiste na caracterização da comunidade indígena do local em estudo (Semenzin et al., 2007). Foca-se na determinação do impacto da contaminação sobre a integridade das comunidades e populações locais (ex. fauna, flora e microrganismos), incluindo aspectos como alterações na diversidade e abundância e alterações na sua actividade. Baseia-se na observação em campo do local contaminado e na sua comparação com um local de referência (Weeks et al., 2004; Jensen e Mesman, 2006),

ou com a condição anterior à contaminação. Preocupa-se com aspectos relacionados com estrutura (ex. diversidade, biomassa, abundância) e funções ecológicas dos solos (ex. decomposição de matéria orgânica, reciclagem de nutrientes, respiração) e com a forma como estas são afectadas (Jensen e Mesman, 2006).

Os processos do solo, a estrutura das comunidades edáficas e as suas funções são parâmetros importantes na análise de risco (CSTEE, 2000; Reinecke et al., 2002; Jensen e Mesman, 2006), sendo estes aspectos abordados na linha de evidência ecológica. Diversos métodos como é o caso dos sacos de folhosa, os mini-recipientes com folhosa, as fitas de algodão e o ensaio de *bait-lamina*, são ensaios sugeridos para estudar e relacionar estes aspectos (Kula e Römbke, 1998; CSTEE, 2000; Knacker et al., 2003; Wentsel et al., 2003). A integração destes parâmetros é essencial para a compreensão das interacções estruturais e funcionais do ecossistema permitindo perceber a ligação existente entre os destinos e efeitos dos contaminantes (Reinecke et al., 2002). A avaliação dos processos de decomposição da matéria orgânica no solo, geralmente considerada útil na expressão da função biológica do solo, está intimamente ligada com a actividade alimentar dos organismos. Avaliando a alteração da actividade alimentar dos organismos do solo obtém-se uma melhor compreensão dos efeitos de contaminantes ou outros factores nos processos de decomposição (Reinecke et al., 2002).

Ensaio de Bait-lamina

O ensaio de *Bait-lamina* foi desenvolvido por Von Törne (1990), como ferramenta para avaliar a actividade alimentar de animais do solo (Kratz, 1998; Larink e Sommer, 2002) e tem sido bastante utilizado na avaliação de perturbações induzidas na decomposição de matéria orgânica por contaminação terrestre (Kratz, 1998; Kula e Römbke, 1998; Reinecke et al., 2002; Wentsel et al., 2003; Filzek et al., 2004; Gongalsky et al., 2004; Casabé et al., 2007). O ensaio de *Bait-lamina* é considerado um método integrativo, uma vez que pode ser utilizado para medir a actividade de invertebrados do solo a diferentes profundidades, e em condições naturais (Kratz, 1998; Wentsel et al., 2003). Tendo como objectivo avaliar os processos de reciclagem da matéria orgânica, este método de avaliação aplica-se essencialmente na camada de húmus e na camada mineral superior do solo, dependendo da espessura destas camadas (Kratz, 1998).

Experimentalmente, o ensaio de *bait-lamina* caracteriza-se por ser simples e de fácil execução. Este ensaio quantifica a capacidade de decomposição de um substrato composto por uma mistura homogénea de celulose, carvão activado e farelo, na proporção em massa de 70:27:3, respectivamente. Esta mistura é inserida nos 16 orifícios (espaçados entre si de 0.5cm) de lâmina de cloreto de polivinil (PVC) com 16cm de comprimento (Figura 2) (*Terra Protecta*, 1999). Posteriormente, as *bait-lamina* são inseridas verticalmente no solo, com o auxílio de um instrumento de dimensões idênticas, ficando deste modo o substrato exposto à actividade dos organismos (Kratz, 1998). Estas ficam expostas no solo durante períodos de tempo a definir para os locais em avaliação, estando a taxa de consumo do substrato dependente da densidade e actividade da comunidade do solo (Van Gestel et al., 2003), assumindo-se por isso que o desaparecimento do mesmo está directamente associado à actividade alimentar dos invertebrados do solo (*Terra Protecta*, 1999). As *bait-lamina* são deixadas em exposição no solo até que cerca de 10-40% do substrato desapareça. Normalmente o tempo de exposição depende do tipo de solo, do seu conteúdo em água e da actividade alimentar dos organismos, sendo recomendado um período de exposição a variar entre 7 e 20 dias (*Terra Protecta*, 1999). Os resultados deste ensaio fornecem uma medição do efeito dos contaminantes na actividade biológica do solo e na distribuição vertical dos organismos que contribuem para o processo de decomposição (Kratz, 1998; Kula e Römbke, 1998; McMillen et al., 2003; Jensen e Mesman, 2006).

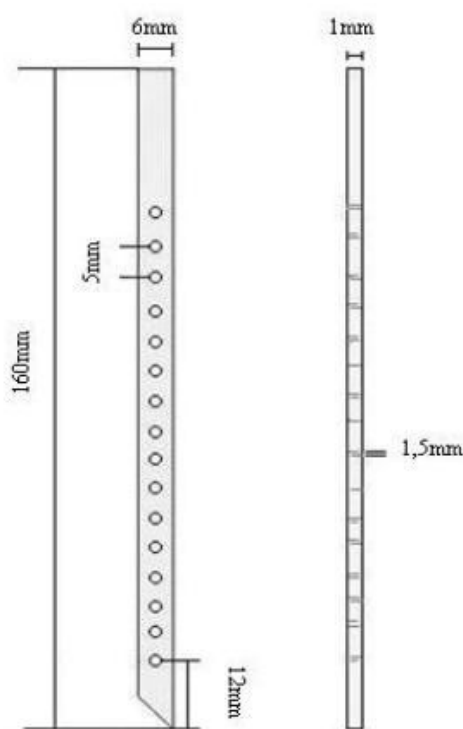


Figura 2 - Dimensões de uma *bait-lamina*.

A importância e a facilidade de execução do ensaio de *bait-lamina* têm sido reconhecidas através da sua vasta aplicação em diferentes avaliações e estudos, nomeadamente:

- em ensaios laboratoriais e de campo para documentar os efeitos de químicos singulares na actividade alimentar de organismos de solo (Kratz, 1998; Geissen e Brümmer, 1999; Larink e Sommer, 2002; Reinecke et al., 2002; Casabé et al., 2007);
- na avaliação do efeito da contaminação por metais, na actividade alimentar da fauna edáfica em solos nas imediações de áreas industriais (Filzek et al., 2004);
- para estudar a influência da temperatura e da humidade na actividade alimentar dos organismos do solo (Gongalsky et al., 2008);
- na recuperação de ecossistemas de turfeiras e na investigação dos impactos promovidos pelas alterações climáticas (*Terra Protecta*, 1999);
- para investigar a heterogeneidade espacial da actividade biótica em solos de zonas temperadas (Irmmler, 1998);

- estudos de efeitos da poluição por metais pesados na actividade alimentar das comunidades detritívoras do solo em planícies aluviais (Hobbelen et al., 2006);

Assim, e em comparação com outros métodos de investigação integrativos da biologia do solo já mencionados anteriormente (e.g. sacos de folhosa, fitas de algodão), o ensaio *bait-lamina* apresenta diversas vantagens e algumas limitações que se encontram referidas na tabela 1.

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens do ensaio de *Bait-lamina* (Kratz, 1998; Kula e Römbke, 1998; *Terra Protecta*, 1999; McMillen et al., 2003; Wentsel et al., 2003; Filzek et al., 2004; Jensen e Mesman, 2006).

Vantagens	Desvantagens
Permite avaliar os efeitos da contaminação na distribuição vertical dos organismos que contribuem para os processos de decomposição.	Outros factores ambientais, para além dos contaminantes, podem ter impacto na actividade alimentar dos organismos do solo, o que pode influenciar os resultados.
Permite obter um elevado número de informação num espaço de tempo relativamente curto e com esforço reduzido.	Apenas substâncias em pó podem ser usadas para fazer o substrato, sendo que a inserção do material nas lâminas pode ser um processo trabalhoso e demorado.
As alterações na actividade sazonal de decomposição podem ser determinadas por colocação de unidades de <i>bait-lamina</i> em diferentes períodos de tempo.	A remoção do substrato pode ser influenciada pelo conteúdo em água do solo, podendo deste modo fornecer resultados falso-positivo.
Em cada ensaio não se obtêm apenas diferenças nos valores da actividade alimentar entre locais de estudo, mas também de padrões de distribuição vertical da actividade alimentar.	Não permite identificar os grupos de organismos do solo que contribuem para os processos de decomposição.
Existem diversas possibilidades para modificar o substrato adaptando-o a diferentes locais.	Não permite quantificar a taxa de decomposição, avaliar a mineralização de nutrientes nem a dinâmica da imobilização no material em decomposição.
Os seus resultados podem ser usados como rastreio ou ser usados como valores de referência para trabalhos futuros.	_____
Metodologia barata e de fácil aplicabilidade.	

Estrutura da dissertação e Objectivos do estudo:

No âmbito da análise de risco ecológico, em curso para a área da mina de urânio da Cunha Baixa (Mangualde, Centro de Portugal), e tendo por base os modelos britânico e holandês para locais contaminados (Weeks et al., 2004; Jensen e Mesman, 2006), o presente trabalho teve como objectivo avaliar os efeitos da contaminação com metais e radionuclídeos, na actividade alimentar da comunidade edáfica usando o ensaio de *bait-lamina*. Este ensaio tem sido recomendado para a etapa 2 deste processo (linha de

evidência ecológica), complementando deste modo a caracterização química e ecotoxicológica dos solos contaminados já efectuada para a zona (Antunes et al., 2008; Pereira et al., 2008).

Dentro deste objectivo geral delinearão-se ainda os seguintes objectivos específicos:

- a) Avaliar o tempo de exposição necessário à distinção dos locais com diferentes níveis de contaminação;
- b) Avaliar o efeito da sazonalidade na distinção dos locais com diferentes níveis de contaminação;
- c) Avaliar a existência de um gradiente vertical nos efeitos da contaminação na actividade alimentar da fauna edáfica e subsequentemente na degradação de matéria orgânica.

O presente trabalho está apresentado em formato de um artigo científico, cuja versão em Inglês, foi já submetida a uma revista internacional da especialidade.

“Bait-lamina assay as a tool to assess the effects of metals contamination in the feeding activity of soil invertebrates within a uranium mine area. André, A.; Antunes, S.C., Gonçalves, F. e Pereira, R. *Submitted to an international Journal*”

MATERIAL E MÉTODOS

Descrição do local de estudo

O local de estudo seleccionado para o desenvolvimento do presente trabalho foi a mina de urânio, actualmente desactivada, situada na povoação da Cunha Baixa (Mangualde, Viseu) onde a exploração de minério radioactivo decorreu entre 1967 e 1993 (Oliveira e Ávila, 1998) (Figura 3). Neste local a exploração mineira levou à criação de uma depressão a céu aberto (Oliveira e Ávila, 1998) e à formação de um pequeno sistema aquático composto por lagoas artificiais temporárias e um efluente ácido subterrâneo (Pedrosa e Martins, 1999). Após a sua desactivação, têm vindo a ser tomadas medidas, no sentido de assegurar a segurança do local explorado, bem como a proceder-se à neutralização do efluente ácido que continua a ser produzido como resultado da lixiviação *in situ* do minério (Oliveira e Ávila, 1998). Apesar destas medidas tem vindo a verificar-se, em vários estudos, a contaminação de águas superficiais ao longo da linha de água principal proveniente da mina, assim como águas subterrâneas situadas nas imediações (Neves et al., 1997; Antunes et al., 2007; Neves e Matias, 2008). Esta contaminação é feita por efluentes ácidos e por uma complexa mistura de metais pesados (Oliveira e Ávila, 1998; Antunes et al., 2008; Neves e Matias, 2008; Pereira et al., 2008). Também se verifica a contaminação de solos, por uma mistura complexa de metais, nomeadamente U, Zn e Cu, resultante da deposição de escórias da mina e lamas provenientes da neutralização do efluente (Oliveira e Ávila, 1998; Antunes et al., 2008; Pereira et al., 2008).

Na área de mina da Cunha Baixa está em curso uma análise de risco ecológico, no âmbito da qual já foi efectuada uma caracterização física e química de solos adjacentes à área de mina (Pereira et al., 2008) e uma avaliação toxicológica preliminar através de um ensaio de evitamento (Antunes et al., 2008).

Ensaio de bait-lamina

O ensaio *bait-lamina* decorreu em 10 locais nas imediações da mina (Figura 3), sendo estes denominados de A a J em função da distância crescente à zona de exploração

subterrânea, posteriormente utilizada para a lexiviação ácida do minério pobre (Pereira et al., 2008). Sendo que J é o local mais afastado a cerca de 3 Km desta zona.

O ensaio de *bait-lamina* foi realizado nas estações de Outono, Inverno, Primavera e Verão (de Outubro de 2007 a Setembro de 2008) de modo a perceber-se a influência da sazonalidade na actividade alimentar da fauna edáfica do solo. Em cada um dos locais de amostragem, e para cada uma das estações, foram recolhidas amostras de solo para caracterização das propriedades física e químicas e para determinação do conteúdo em metais.

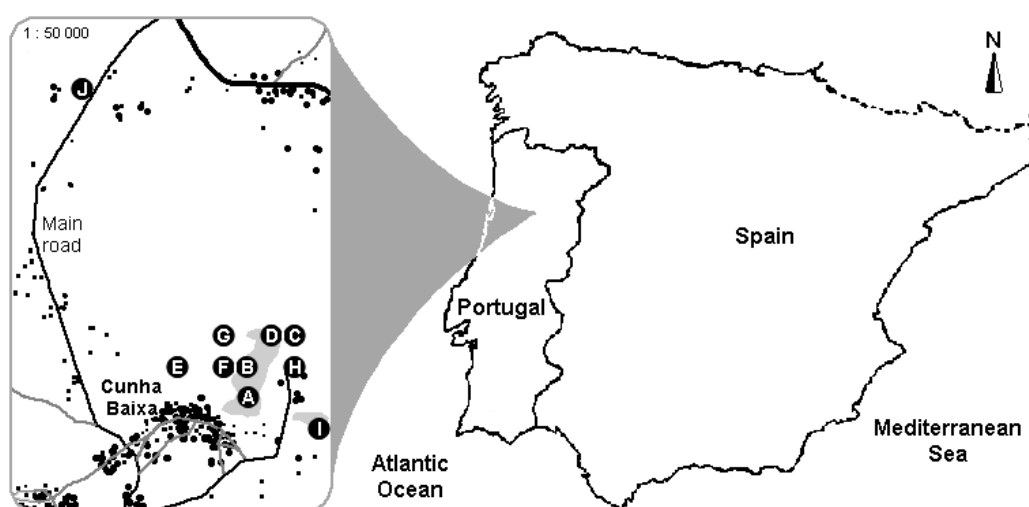


Figura 3 – Localização geográfica da Mina de urânio da Cunha Baixa e distribuição dos locais de estudo (adaptado de Antunes et al., 2008).

Para a execução do ensaio, foram adquiridas *bait-lamina* na *Terra Protecta*® GmbH, Berlim, Alemanha (Figura 2). Cada *bait-lamina* consiste numa lâmina de cloreto de polivinil (PVC) com 16cm de comprimento, constituída por 16 orifícios (espaçados entre si de 0,5cm). Em cada orifício foi inserido um substrato composto por uma mistura homogénea de celulose, farelo de trigo e carbono activado nas proporções em massa de 70:27:3, respectivamente. Este substrato foi preparado de acordo a metodologia proposta pelo fornecedor *Terra Protecta* (1999).

Em cada local de amostragem foram colocadas 96 *bait-lamina*, divididas em seis grupos de 16 lâminas por cada ponto de amostragem. As *bait-lamina* foram inseridas verticalmente no solo, com o auxílio de uma pá com a qual foi feita uma fenda no solo (Figura 4A-C). O ensaio decorreu ao longo de 7 e 14 dias, tendo-se retirado, para cada

local, 3 grupos de 16 *bait-lamina* no final de cada período de exposição. As *bait-lamina* foram guardadas em sacos de plástico individualizados para posterior processamento (Figura 4D), o qual foi levado a cabo imediatamente após a chegada ao laboratório. Adicionalmente, foi registada a temperatura dos solos, usando um termómetro Dostmann electronic[®] GmbH P400 Serie, em três momentos durante o período de exposição das *bait-lamina*. Os resultados da exposição das *bait-lamina* foram expressos, tendo em consideração o estado das perfurações (1 - vazio, 2 - cheio e 3 - parcialmente vazio) (Figura 5).



Figura 4 - Colocação das *bait-lamina* nos locais de estudo (A-C); recolha e medição da temperatura (D).

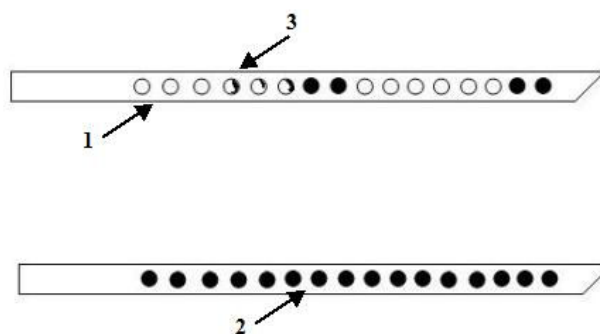


Figura 5 – Critério de classificação do interior dos buracos: 1 - vazio, 2 - cheio e 3 - parcialmente vazio.

Determinação dos parâmetros Físico-químicos do solo

Em cada umas das estações de amostragem e, em paralelo com a exposição das *bait-lamina in situ*, foram recolhidas 3 amostras compostas de solo superficial (0-15cm) de cada local de amostragem para se proceder à caracterização físico-química do mesmo. Em laboratório as amostras de solo foram secas ao ar e crivadas (<2mm) sendo a fracção <2mm reservada para determinação dos parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, conteúdo em matéria orgânica, conteúdo em água, capacidade de retenção da água dos solos e conteúdo em metais).

O pH do solo foi medido numa suspensão composta por solo e solução de KCl (1M) (1:5 m/v) (ISO, 2005). Para o efeito, foram pesadas 10g de cada amostra de solo, em frascos de polipropileno, às quais foram adicionados 50ml de solução de KCl (1M). As misturas foram colocadas a agitar durante 15 minutos, e posteriormente deixadas a repousar durante 1h. Após esse tempo foi medido o pH da solução aquosa sobrenadante usando um medidor de pH pré-calibrado WTW 330/SET-2.

Para a medição da condutividade foi preparada uma solução, composta por solo e água destilada (1:5 m/v), preparada de acordo com o mesmo procedimento utilizado para a medição de pH (FAOUN, 1984), mas em que a mistura depois de agitada mecanicamente, foi posteriormente deixada em repouso por um período de 12h. Após esse tempo a condutividade da solução aquosa sobrenadante foi medida com um medidor de condutividade LF 330/SET (FAOUN, 1984).

O conteúdo em água do solo foi determinada a partir da perda de peso após secagem a 105°C, durante 24h. O conteúdo em matéria orgânica foi determinado por perda de ignição a 450°C durante 8h (SPAC, 2000).

A capacidade de retenção da água (CRA) de cada amostra de solo foi determinada em cada uma das três amostras de cada local (ISO, 2005). As amostras de solo foram colocadas em frascos de polipropileno com o fundo recortado e substituído por papel de filtro, e imersas em água durante 3h. Após este período, as amostras foram deixadas a secar durante 2h com papel absorvente para retirar o excesso de água. A CRA foi determinada por pesagem de cada uma das réplicas antes e depois da secagem a 105°C até à estabilização do peso (ISO, 2005). A capacidade de retenção da água das amostras apenas foi determinada numa das amostragens sazonais dado que este parâmetro depende das propriedades intrínsecas do solo, não apresentado por isso grandes variações ao longo do tempo, a menos que a estrutura do solo seja alterada.

Concentração pseudo-total de metais

Para determinar a concentração pseudo-total de metais, digeriu-se 1g de cada amostra de solo (3 por local) com *aqua regia* (3ml de ácido clorídrico, a 37% *Pro analysis* Panreac® + 1ml de ácido nítrico Suprapur Merck® 65%) em frascos de teflon. A mistura foi cuidadosamente aquecida num banho de areia a 100°C. De seguida, adicionaram-se 10ml de HNO₃ (4N) e a solução foi filtrada através de filtros FT30/0,2CA-S de 0,2µm de poro, para remover partículas minerais que persistiram. Seguidamente, cada amostra foi transferida para um tubo volumétrico de polipropileno de 25ml. O volume total foi acertado para 25ml com água Milli-Q® (18,2Ω). A concentração pseudo-total de metais foi analisada por ICP-MS.

Análise estatística

De forma a comparar os diferentes solos, integrando todas as variáveis físicas e químicas medidas foram realizadas duas análises de variância multivariada (MANOVAs) (Zar, 1996), integrando todos os dados físicos e químicos, numa das análises (pH, condutividade, conteúdo em água, conteúdo em matéria orgânica, capacidade de retenção

da água) e as concentrações pseudo-totais de metais na outra. Seguidamente, e de modo a perceber o contributo de cada uma das variáveis para as diferenças registadas entre solos, foram efectuadas análises de variância unifactoriais (Zar, 1996).

A percentagem média de buracos vazios de cada grupo de 16 *bait-lamina* foi transformada usando a equação $x' = \arcsen(\sqrt{x})$, de modo a satisfazer os pressupostos da análise de variância bifactorial (Zar, 1996). Assim primeiramente, com esta análise pretendeu-se avaliar o efeito dos locais e das estações do ano na actividade alimentar dos organismos edáficos, assim como a existência de uma interacção significativa entre estes dois factores. Esta primeira análise foi feita para os dois períodos de exposição analisados (7 e 14 dias) de forma independente. Quando se registam diferenças significativas na actividade alimentar, entre estações do ano e locais de amostragem, assim como uma interacção significativa entre estes dois factores, prosseguiu-se a análise estatística dos dados realizando análises de variância unifactoriais (ANOVAs) (Zar, 1996), seguidas de um teste *Tukey* (Zar, 1996) de comparações múltiplas para verificar, para cada uma das estações do ano as diferenças significativas entre locais, no que refere à actividade alimentar da fauna edáfica.

Para o período de exposição de 14 dias, realizou-se ainda uma análise de variância (ANOVA) bifactorial (Zar, 1996) para analisar a influência dos factores profundidade (N1 e N2) e estação do ano, na actividade alimentar da fauna edáfica. Os dados utilizados nesta análise correspondem à média dos buracos vazios nas 16 *bait-lamina* de cada grupo, considerados em dois níveis de profundidade: N1, correspondente aos 4cm mais superficiais (8 buracos) e N2 para os 4cm mais profundos (8 buracos). A profundidade está relacionada com a distância que cada buraco na *bait-lamina* tem entre si que é de 0,5cm.

Os coeficientes de correlação de Pearson (Zar, 1996) foram calculados de forma a avaliar possíveis correlações entre as percentagens médias de actividade e os diferentes parâmetros físicos e químicos avaliados.

RESULTADOS

Nas tabelas 2, 3 e 4 apresentam-se os dados obtidos para a caracterização física e química dos solos amostrados. Pela análise da tabela 2 verifica-se que a maioria dos solos se caracteriza por apresentarem valores acídicos ($3,54 \pm 0,0$ a $4,90 \pm 0,0$), com exceção dos locais B, D e G onde se registaram os valores de pH mais elevados com tendência para alcalinos ($6,69 \pm 0,1$ a $7,76 \pm 0,1$). Verifica-se ainda que os solos onde se registaram os valores mais elevados de pH são os mesmos solos que apresentam valores de condutividade mais elevados, nomeadamente na estação do Verão, onde se registaram os valores médios mais altos (B= $2396,67 \pm 5,8 \mu\text{S}/\text{cm}$; D= $419,33 \pm 7,4 \mu\text{S}/\text{cm}$ G= $2243,33 \pm 20,8 \mu\text{S}/\text{cm}$). Relativamente ao conteúdo em água dos solos, regra geral, observaram-se valores mais elevados na Primavera ($3,41 \pm 0,3$ a $32,13 \pm 0,4\%$), comparativamente com as restantes estações, à exceção do solo D que registou valores mais elevados de humidade no Verão. Os solos B e D destacam-se por apresentarem valores elevados de humidade no Verão, tendo-se registado um conteúdo médio em água nestes solos de $10,81 \pm 0,6\%$ e $63,03 \pm 0,3\%$ respectivamente. A capacidade de retenção da água dos solos apresentou um padrão bastante idêntico aos valores registados para o conteúdo em água do solo, na medida em que os valores médios mais elevados foram observados para os solos B ($84,36 \pm 0,9\%$) e D ($85,41 \pm 5,5\%$) (Tabela 2). Quanto ao conteúdo em matéria orgânica, regra geral, foi na estação de Outono onde se registaram as percentagens mais elevadas. As amostras de solo A, C, F e G caracterizaram-se por apresentarem percentagens médias mais baixas de matéria orgânica ($<2\%$) em contraste com o solo D que apresentou valores idênticos em todas as estações ($8,49 \pm 0,5$ a $9,74 \pm 0,6\%$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Parâmetros físicos e químicos registados nas amostras de solo, dos diferentes locais de amostragem, determinados para as 4 estações do ano (média \pm desvio padrão).

		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
pH (KCl)	Out.	3,80 $\pm 0,0$	7,53 $\pm 0,1$	4,55 $\pm 0,0$	7,70 $\pm 0,1$	4,16 $\pm 0,1$	3,86 $\pm 0,1$	7,23 $\pm 0,0$	5,08 $\pm 0,3$	3,96 $\pm 0,0$	3,78 $\pm 0,0$
	Inv.	4,82 $\pm 0,0$	7,20 $\pm 0,1$	4,63 $\pm 0,1$	7,47 $\pm 0,1$	4,60 $\pm 0,1$	4,58 $\pm 0,1$	6,69 $\pm 0,1$	4,66 $\pm 0,0$	4,90 $\pm 0,0$	3,88 $\pm 0,0$
	Prim.	3,99 $\pm 0,0$	7,45 $\pm 0,0$	4,23 $\pm 0,1$	7,53 $\pm 0,1$	4,09 $\pm 0,1$	4,02 $\pm 0,0$	7,15 $\pm 0,1$	4,70 $\pm 0,0$	4,71 $\pm 0,0$	3,54 $\pm 0,0$
	Ver.	3,90 $\pm 0,0$	7,25 $\pm 0,1$	4,29 $\pm 0,0$	7,76 $\pm 0,1$	4,24 $\pm 0,1$	4,21 $\pm 0,0$	7,04 $\pm 0,2$	4,82 $\pm 0,1$	4,23 $\pm 0,0$	3,60 $\pm 0,0$
Cond ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Out.	15,34 $\pm 0,7$	464,33 $\pm 9,6$	3,96 $\pm 0,1$	75,00 $\pm 1,2$	36,10 $\pm 4,2$	5,12 $\pm 0,2$	280,67 $\pm 5,5$	11,00 $\pm 0,4$	3,23 $\pm 0,3$	3,56 $\pm 0,2$
	Inv.	24,10 $\pm 4,5$	2270,00 $\pm 17,3$	25,43 $\pm 7,3$	313,33 $\pm 5,8$	57,40 $\pm 25,9$	15,37 $\pm 2,6$	1080,00 $\pm 52,0$	21,70 $\pm 1,6$	24,25 $\pm 2,6$	23,43 $\pm 1,1$
	Prim.	15,55 $\pm 1,4$	2043,33 $\pm 25,2$	11,62 $\pm 2,7$	319,33 $\pm 9,0$	16,41 $\pm 1,2$	43,10 $\pm 10,8$	1661,67 $\pm 180,0$	89,37 $\pm 16,3$	21,83 $\pm 0,9$	15,62 $\pm 0,8$
	Ver.	58,70 $\pm 2,2$	2396,67 $\pm 5,8$	22,97 $\pm 1,8$	419,33 $\pm 7,4$	57,86 $\pm 4,8$	165,10 $\pm 23,6$	2243,33 $\pm 20,8$	67,27 $\pm 3,1$	23,50 $\pm 1,0$	23,07 $\pm 0,9$
MO (%)	Out.	1,2 $\pm 0,3$	6,96 $\pm 0,3$	1,42 $\pm 0,3$	8,49 $\pm 0,5$	5,79 $\pm 0,1$	1,49 $\pm 0,5$	1,87 $\pm 0,1$	8,46 $\pm 0,7$	5,81 $\pm 0,0$	6,89 $\pm 0,3$
	Inv.	0,63 $\pm 0,0$	3,99 $\pm 0,2$	0,88 $\pm 0,1$	8,92 $\pm 0,5$	4,82 $\pm 0,2$	0,98 $\pm 0,3$	1,26 $\pm 0,0$	2,63 $\pm 0,1$	2,82 $\pm 0,1$	6,27 $\pm 0,4$
	Prim.	0,88 $\pm 0,1$	4,33 $\pm 0,1$	0,99 $\pm 0,1$	8,92 $\pm 0,7$	1,89 $\pm 0,1$	1,78 $\pm 0,2$	1,40 $\pm 0,1$	3,33 $\pm 0,1$	2,69 $\pm 0,1$	4,97 $\pm 0,2$
	Ver.	0,84 $\pm 0,3$	5,85 $\pm 0,4$	2,03 $\pm 0,1$	9,74 $\pm 0,6$	2,80 $\pm 0,1$	1,48 $\pm 0,7$	3,99 $\pm 0,2$	6,24 $\pm 0,1$	3,71 $\pm 0,0$	5,19 $\pm 0,6$
Humidade (%)	Out.	1,80 $\pm 0,0$	15,75 $\pm 2,1$	1,78 $\pm 0,1$	29,97 $\pm 1,2$	2,44 $\pm 0,3$	1,56 $\pm 0,0$	2,43 $\pm 0,1$	2,74 $\pm 0,2$	2,51 $\pm 0,1$	1,99 $\pm 0,0$
	Inv.	1,09 $\pm 0,0$	12,48 $\pm 0,2$	1,55 $\pm 0,1$	20,59 $\pm 0,5$	1,75 $\pm 0,0$	0,95 $\pm 0,0$	1,37 $\pm 0,1$	1,29 $\pm 0,1$	1,58 $\pm 0,0$	1,70 $\pm 0,1$
	Prim.	6,78 $\pm 0,2$	32,13 $\pm 0,4$	4,91 $\pm 0,2$	30,89 $\pm 0,2$	6,40 $\pm 0,4$	6,81 $\pm 0,1$	10,58 $\pm 0,1$	3,41 $\pm 0,3$	11,51 $\pm 0,4$	12,04 $\pm 0,2$
	Ver.	1,28 $\pm 0,1$	10,81 $\pm 0,6$	0,16 $\pm 0,1$	63,03 $\pm 0,3$	0,43 $\pm 0,2$	0,22 $\pm 0,2$	3,58 $\pm 0,1$	0,63 $\pm 0,2$	0,99 $\pm 0,1$	0,77 $\pm 0,1$
CRA (%)		21,08 $\pm 0,8$	84,36 $\pm 0,9$	26,33 $\pm 0,2$	85,41 $\pm 5,5$	34,81 $\pm 3,9$	25,85 $\pm 1,3$	31,36 $\pm 1,6$	41,93 $\pm 3,0$	9,24 $\pm 1,3$	40,71 $\pm 0,7$

Na tabela 3 estão representadas as concentrações pseudo-totais dos metais analisados para as diferentes amostras de solo, após extracção com *aqua regia*. Pela análise da tabela é possível verificar que o cádmio ($\text{Cd}=0,0\pm 0,0$ a $4,3\pm 0,2\mu\text{g/g}$) é o metal que apresentou menor concentração em todas as amostras de solo analisadas, em contraste com o ferro ($\text{Fe}=5912,0\pm 276,2$ a $24050\pm 1364,3\mu\text{g/g}$) e o alumínio ($\text{Al}=6848\pm 851,7$ a $26480,0\pm 1595,5\mu\text{g/g}$). Os solos B, D e G caracterizaram-se por serem os solos com o

conteúdo em metais mais elevado. A MANOVA efectuada para o conjunto de metais analisados revelou a existência de diferenças estatísticas significativas (MANOVA *Pillai's trace*=7,53; $F(99,162) = 8,40$; $p < 0,001$) entre os solos analisados no que concerne ao teor nestes elementos, nas diferentes amostras analisadas. Após a MANOVA realizaram-se análises de variância unifactoriais (Tabela 4), de modo a verificar quais os metais que apresentavam uma contribuição significativamente superior para o registo de diferenças entre os locais. Assim, na tabela 4 onde estão representados os valores de F , verifica-se que o níquel (Ni, $F=930,630$) é o principal metal responsável pelas diferenças entre os solos, seguido do berílio (Be, $F=846,969$), zinco (Zn, $F=812,404$), manganês (Mn, $F=652,704$) e do cádmio (Cd, $F=606,535$). A MANOVA realizada com os parâmetros físico-químicos demonstrou haver diferenças estatísticas (MANOVA *Pillai's trace*=4,87; $F(45,100) = 86,37$; $p < 0,001$), entre os solos dos diferentes locais. Os resultados das ANOVAs unifactoriais efectuadas posteriormente demonstraram que todos os parâmetros apresentam diferenças significativas, no entanto, os parâmetros com a contribuição mais significativa para distinguir os solos foram: a condutividade ($F=4911,811$), pH ($F=766,381$) e o conteúdo em água do solo ($F=428,476$).

Tabela 3 – Concentração pseudo-total de metais ($\mu\text{g/g}$) presentes em cada amostra de solo (média \pm desvio padrão). A negrito encontram-se os valores mais elevados para os metais considerados. Os locais nos quais se registaram os maiores conteúdos em metal encontram-se sublinhados, assim como os metais onde se verificaram as concentrações mais elevadas.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Al	9392,7 $\pm 835,4$	26440,0 $\pm 1109,8$	7905,3 $\pm 3411,5$	26480,0 $\pm 1595,5$	18283,3 $\pm 2794,3$	22760,0 $\pm 1969,8$	21372,7 $\pm 3343,0$	8790,7 $\pm 1051,2$	6848,0 $\pm 851,7$	12254,7 $\pm 180,5$
Ba	11,3 $\pm 3,6$	8,5 $\pm 14,0$	20,4 $\pm 13,3$	225,6 $\pm 14,5$	17,9 $\pm 2,1$	21,2 $\pm 18,9$	79,9 $\pm 12,7$	16,5 $\pm 2,4$	7,7 $\pm 5,7$	7,4 $\pm 0,1$
Be	2,3 $\pm 0,2$	50,1 $\pm 4,3$	2,6 $\pm 0,2$	95,6 $\pm 3,8$	3,6 $\pm 0,1$	2,4 $\pm 0,2$	9,7 $\pm 1,1$	2,7 $\pm 0,4$	2,8 $\pm 0,2$	1,3 $\pm 0,1$
Cd	0,1 $\pm 0,0$	2,6 $\pm 0,2$	0,1 $\pm 0,0$	4,3 $\pm 0,2$	0,1 $\pm 0,0$	0,07 $\pm 0,0$	0,4 $\pm 0,0$	0,2 $\pm 0,0$	0,10 $\pm 0,1$	0,0 $\pm 0,0$
Fe	10490,7 $\pm 718,6$	13383,3 $\pm 654,4$	8588,0 $\pm 537,4$	24050,0 $\pm 1364,3$	10812,0 $\pm 989,1$	12967,3 $\pm 158,1$	17339,6 $\pm 1603,4$	13175,3 ± 2752	8728,0 $\pm 332,6$	5912,0 $\pm 276,2$
Mn	144,7 $\pm 19,3$	3711,3 $\pm 103,3$	398,4 $\pm 156,8$	6709,3 $\pm 322,2$	267,2 $\pm 15,2$	178,4 $\pm 38,9$	832,0 $\pm 139,3$	323,9 $\pm 20,7$	287,4 $\pm 240,8$	228,8 $\pm 6,8$
Ni	5,0 $\pm 0,9$	91,4 $\pm 1,5$	2,8 $\pm 1,7$	160,6 $\pm 8,9$	2,6 $\pm 0,1$	3,2 $\pm 0,4$	22,5 $\pm 2,8$	4,3 $\pm 0,9$	1,6 $\pm 0,3$	1,2 $\pm 0,2$
Pb	16,1 $\pm 0,9$	9,7 $\pm 0,7$	7,2 $\pm 0,9$	10,2 $\pm 0,8$	13,9 $\pm 1,1$	14,4 $\pm 1,7$	14,2 $\pm 1,1$	34,1 $\pm 1,6$	9,6 $\pm 5,5$	12,6 $\pm 0,5$
Sr	3,8 $\pm 0,2$	19,3 $\pm 12,4$	6,2 $\pm 0,8$	48,4 $\pm 2,0$	6,6 $\pm 0,5$	5,4 $\pm 0,1$	11,3 $\pm 1,5$	7,8 $\pm 0,5$	4,8 $\pm 0,6$	5,7 $\pm 0,0$
U	289,0 $\pm 155,7$	215,7 $\pm 8,5$	103,3 $\pm 4,0$	1408,0 $\pm 54,1$	113,4 $\pm 10,5$	99,2 $\pm 1,9$	210,6 $\pm 29,2$	189,0 $\pm 2,5$	94,0 $\pm 8,4$	6,1 $\pm 0,4$
Zn	57,0 $\pm 4,2$	511,7 $\pm 4,9$	46,9 $\pm 6,4$	1109,0 $\pm 59,1$	75,8 $\pm 25,8$	73,33 $\pm 0,7$	151,3 $\pm 8,5$	88,1 $\pm 4,5$	52,0 $\pm 3,8$	33,8 $\pm 0,5$

Tabela 4 – Resumo das ANOVAs unifactoriais efectuadas para os metais e parâmetros físico-químicos. Os valores mais elevados de F encontram-se destacados a negrito.

	g.l.	F	p
Al	9, 20	45,503	<0,001
Ba	9, 20	120,210	<0,001
Be	9, 20	846,969	<0,001
Cd	9, 20	606,535	<0,001
Fe	9, 20	54,999	<0,001
Mn	9, 20	652,704	<0,001
Ni	9, 20	930,630	<0,001
Pb	9, 20	41,137	<0,001
Sr	9, 20	34,151	<0,001
U	9, 20	175,541	<0,001
Zn	9, 20	812,404	<0,001
Cond	9, 20	4911,811	<0,001
CRA	9, 20	311,528	<0,001
Humidade	9, 20	428,476	<0,001
MO	9, 20	185,861	<0,001
pH	9, 20	766,381	<0,001

Na figura 6 está registada a variação na temperatura média entre os 10 locais de amostragem, durante a exposição das *bait-lamina*, nas 4 estações do ano. Pela análise da figura, verifica-se que as temperaturas mais elevadas, como seria de esperar registaram-se no Verão ($17,05 \pm 0,3$ a $26,18 \pm 0,4^\circ\text{C}$) em contraste com o Outono onde se registaram as temperaturas mais baixas ($4,6 \pm 0,5$ a $9,8 \pm 1,1^\circ\text{C}$). No local A registaram-se, no geral, as temperaturas médias mais elevadas ($9,8 \pm 1,1$ a $26,18 \pm 0,4^\circ\text{C}$) É ainda de destacar os picos de temperatura registados no local E no Inverno ($12,22 \pm 1,6^\circ\text{C}$) e no Verão ($22,77 \pm 0,5^\circ\text{C}$), e no local J durante a estação de Inverno ($11,65 \pm 1,9^\circ\text{C}$).

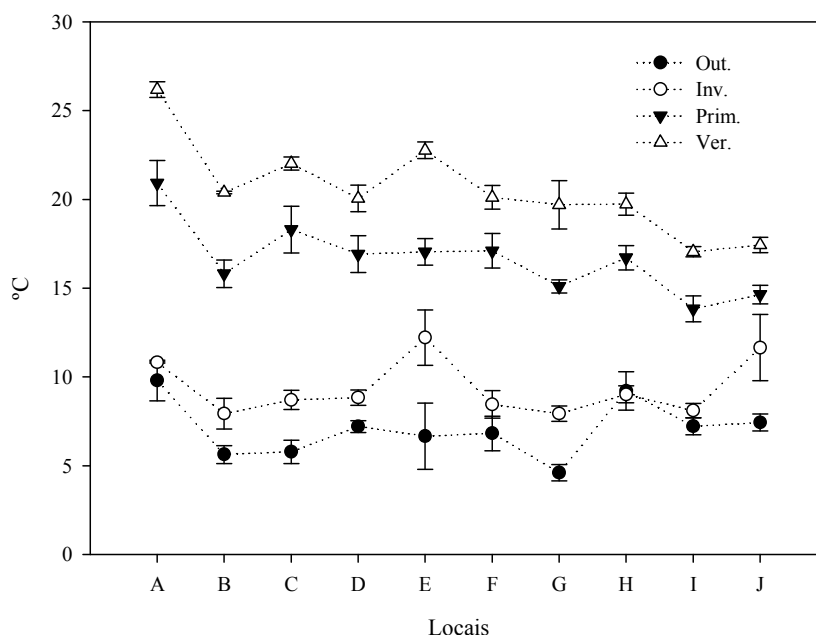


Figura 6 - Variação da temperatura (média \pm erro padrão) entre os diferentes locais de amostragem, durante a exposição das *bait-lamina*, nas 4 estações do ano.

Nas figuras 7 e 8 apresentam-se os resultados obtidos nos ensaios de exposição de *bait-lamina* (7 e 14 dias de exposição) realizados, na área da mina da Cunha Baixa, nas quatro estações do ano. Os resultados apresentam-se expressos em termos de percentagem média de buracos vazios tendo em consideração a profundidade. A profundidade apresentada corresponde à distância entre cada buraco na *bait-lamina* (0,5cm ver Figura 2). Da análise das figuras 7 e 8 é possível notar que as percentagens médias de actividade, foram superiores após 14 dias de exposição *in situ*, das lâminas, e sobretudo no Outono, (barras brancas, na figura 8). Em oposição e de uma maneira geral, as percentagens médias de actividade registadas após 7 dias de exposição foram sempre extremamente reduzidas ($\leq 11,33\%$, no local I, Outono). Nas tabelas 5, 6, 7, e 8 estão representados os resultados da análise estatística dos dados referentes a estes mesmos ensaios. Assim, na tabela 5 é possível verificar que para o período de exposição de 7 dias, apenas se verificaram diferenças significativas na actividade alimentar da fauna edáfica entre estações do ano ($p < 0,001$) e que existe uma interacção significativa entre este factor e os locais de amostragem ($p = 0,019$). Este período de exposição não foi suficiente para discriminar os diferentes locais dentro da área mineira com base neste parâmetro ($p = 0,172$).

No período de exposição de 14 dias registam-se diferenças significativas na actividade alimentar dos organismos edáficos, entre locais ($p<0,001$), entre estações do ano ($p<0,001$), tendo-se ainda registado uma interacção significativa entre estas duas variáveis ($p<0,001$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Resumo da ANOVA bifactorial para a actividade alimentar entre locais e estações do ano, para o período de exposição de 7 e 14 dias. A negrito realçam-se os valores que apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p<0,05$).

Período de exposição	Variáveis	g.l.	F	p
7dias	Locais	9, 80	1,47	0,172
	Estação	3, 80	6,66	<0,001
	Locais x Estação	27, 80	1,85	0,019
14dias	Locais	9, 80	18,04	<0,001
	Estação	3, 80	143,07	<0,001
	Locais x Estação	27, 80	12,08	<0,001

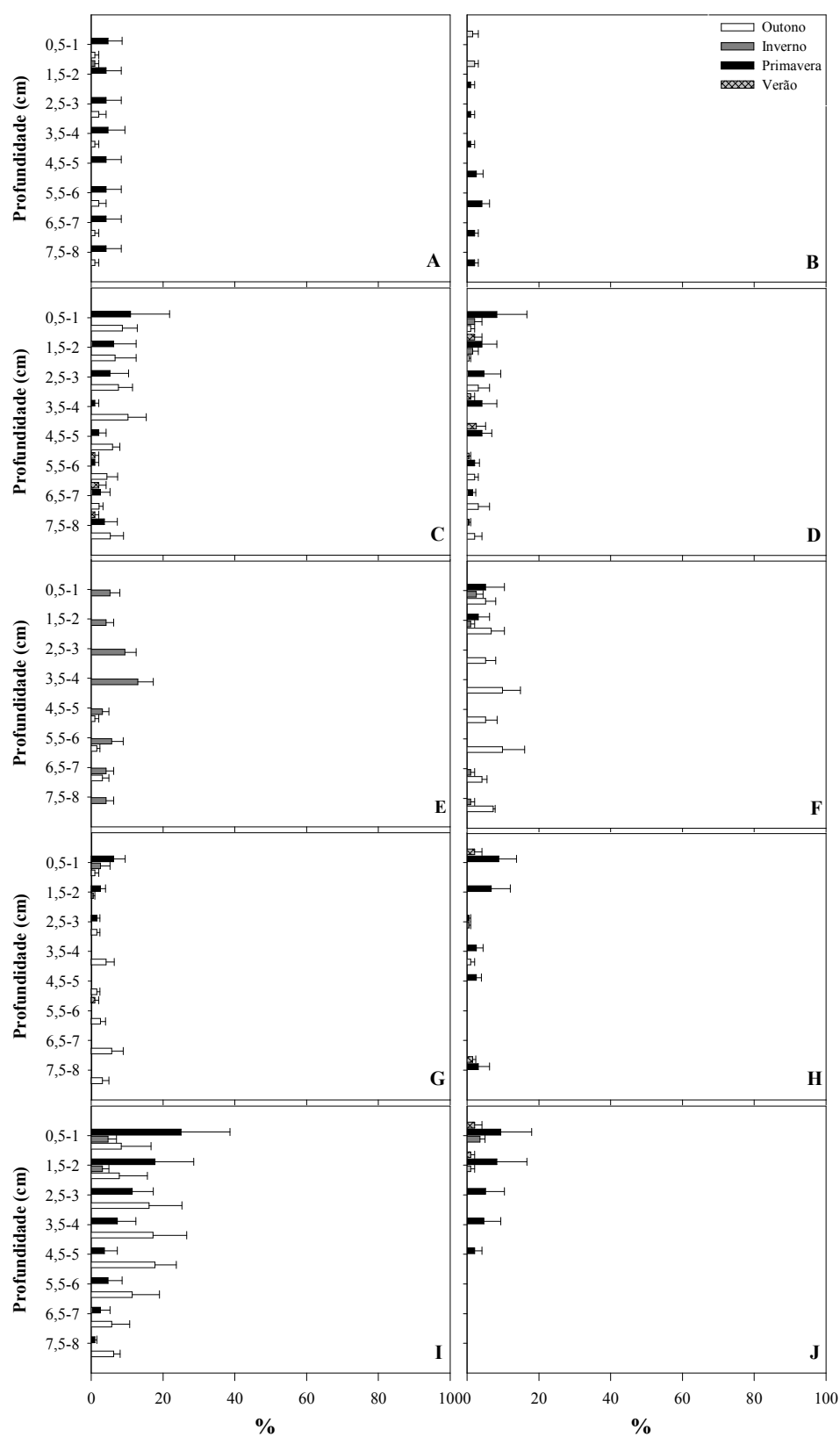


Figura 7 - Percentagem de buracos vazios (médica ± erro padrão) em função da profundidade, para os diferentes locais de amostragem (A a J), na área da mina da Cunha Baixa, ao fim de 7 dias de exposição para as 4 estações do ano.

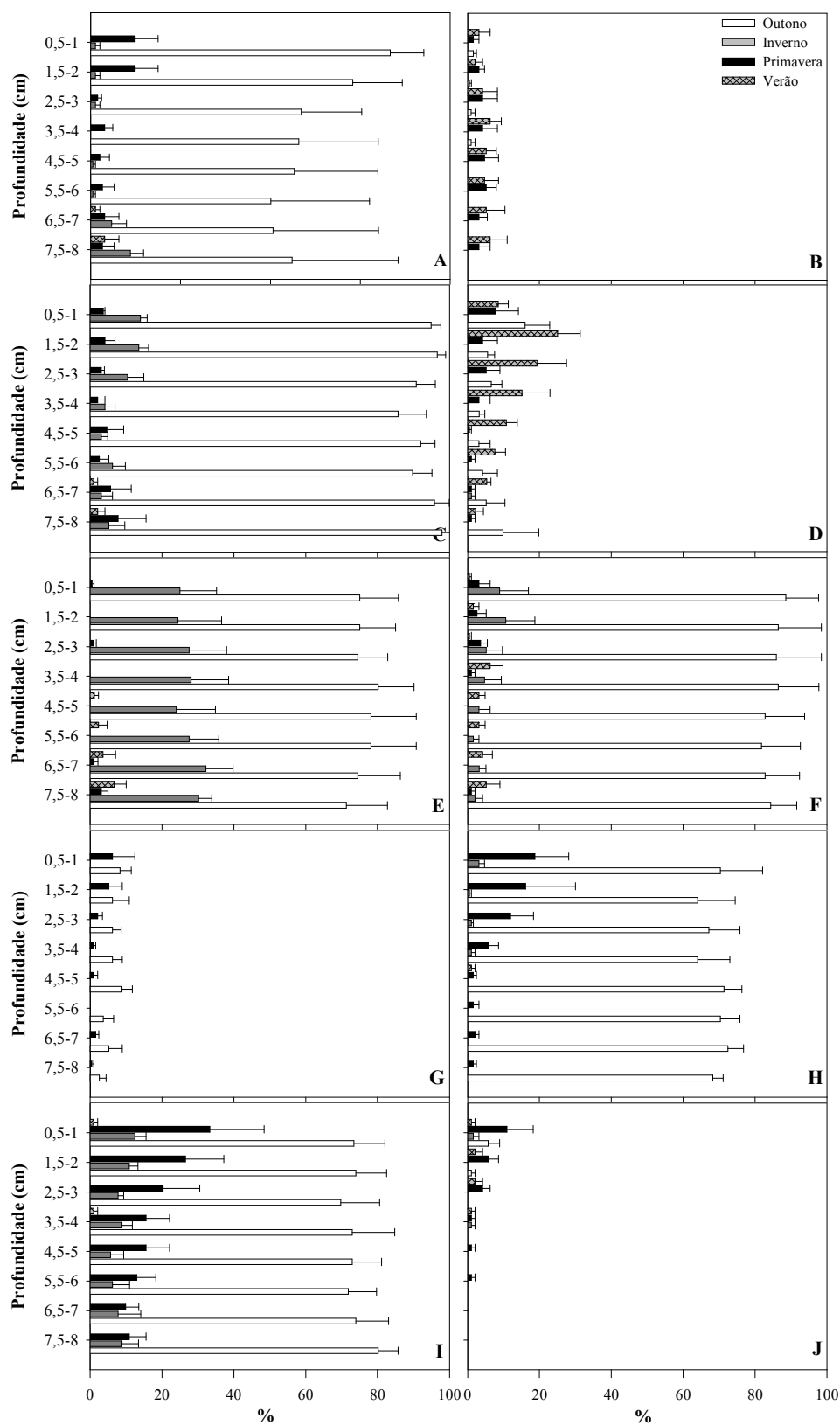


Figura 8 - Percentagem de buracos vazios (média \pm erro padrão) em função da profundidade, para os diferentes locais de amostragem (A a J) na área da mina da Cunha Baixa, ao fim de 14 dias de exposição para as 4 estações do ano.

A análise das figuras 7 e 8 e da tabela 5 revela que, a percentagem de buracos vazios registada foi significativamente superior na exposição de 14 dias. Dentro deste período de exposição é ainda possível observar que para a maioria dos locais de amostragem a percentagem mais elevada de buracos vazios, e subsequente a maior actividade da fauna edáfica, foi registada no Outono (barras a branco da figura 8). Nesta mesma figura é possível observar que houve uma redução significativa da actividade alimentar dos organismos nos locais B, D, G e J. Nos outros locais situados na área de mina (A, C, F e H) verificou-se uma actividade alimentar reduzida excepto no Outono. Nesta estação foram registadas correlações negativas e significativas entre a actividade alimentar dos invertebrados do solo e todos os parâmetros físicos e químicos avaliados (excepto a temperatura) e com as concentrações pseudo-totais de metais. Contudo estas correlações foram particularmente fortes com o pH ($r=-0,614$; $n=30$; $p<0,001$), a capacidade de retenção de água ($r=-0,615$; $n=30$; $p<0,001$), o cádmio (Cd, $r=-0,707$; $n=30$; $p<0,001$), o níquel (Ni, $r=-0,687$; $n=30$; $p<0,001$), o manganês (Mn, $r=-0,687$; $n=30$; $p<0,001$) e o zinco (Zn, $r=-0,684$; $n=30$; $p<0,001$). Em relação aos locais considerados inicialmente como potenciais locais de referência (I e J) (*ver* Pereira et al., 2008), apenas o local I apresenta maior percentagem de buracos vazios, principalmente no Outono (73,63%) e na Primavera (18,16%), em comparação com o local J onde a actividade alimentar foi sempre muito reduzida (*ver* figura 8). De facto uma correlação significativamente negativa com o conteúdo de matéria orgânica do solo foi registada no Outono ($r=-0,392$; $n=30$; $p=0,0323$). Esta correlação tornou-se significativamente positiva no Verão ($r=0,500$; $n=30$; $p<0,001$), provavelmente porque um elevado conteúdo em matéria orgânica favorece um aumento do conteúdo em água no solo, nesta estação em que temperatura média é mais elevada. Pela interpretação da tabela 5, ainda é possível verifica que o factor estação do ano teve um efeito significativo na actividade alimentar dos organismos, o qual foi detectado logo após os 7 dias de exposição. De acordo com estes resultados, e pela análise das figuras 7 e 8, a exposição de 7 dias não se apresentou como um período de tempo suficiente para discriminar os locais de estudo de modo a avaliar o impacto da contaminação na actividade alimentar das comunidades edáficas, dado que de uma forma geral, a percentagem média de buracos vazios registados neste período de exposição foi bastante reduzida. Deste modo, e de acordo com o descrito na secção de material e métodos, a análise estatística prosseguiu apenas com os dados referentes aos 14 dias de exposição.

Partindo da análise dos dados referentes a 14 dias de exposição e de modo a verificar as diferenças da actividade alimentar dos organismos entre os locais, para cada uma das estações de amostragem, de forma independente, dado que a interacção entre os factores estação do ano e local foi significativa ($p < 0,001$, Tabela 5), foram efectuadas análises de variância (ANOVAs) unifactoriais ($p < 0,05$) (Tabela 6) seguidas de um teste *Tukey* (Tabela 7).

Tabela 6 – Tabela resumo das ANOVAs unifactoriais realizadas para avaliar as diferenças da actividade alimentar entre locais de amostragem, na mina de urânio da Cunha Baixa, por estação do ano. A negrito realçam-se os valores que apresentam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$).

Estação de exposição	Variáveis	g.l.	F	p
Outono	Local	9, 20	21,94	<0,001
Inverno		9, 20	9,95	<0,001
Primavera		9, 20	1,72	0,150
Verão		9, 20	4,67	0,002

Tabela 7 – Resumo dos testes de *Tukey* realizados para os dados de cada estação de modo, a identificar as diferenças significativas entre os locais ($p < 0,05$), para o período de exposição de 14 dias. (*) Não foram registadas diferenças significativas ($p < 0,05$).

Locais	Estações			
	Outono	Inverno	Primavera (*)	Verão
A	a, c	a, c	-	a
B	b	c	-	a, b
C	d	a, c	-	a
D	b, c	a, c	-	b
E	a, d	b	-	a, b
F	a, d	a, c	-	a, b
G	b, c	c	-	a
H	a, d	a, c	-	a
I	a, d	a, b	-	a
J	b	a, c	-	a

A análise das tabelas 6 e 7 e da figura 8 revela que após 14 dias de exposição foi possível registar diferenças significativas na actividade alimentar dos organismos edáficos entre os locais, em cada uma das 4 estações do ano. No Outono, a estação para a qual se registaram percentagens de actividade mais elevadas, a actividade alimentar apresentou uma redução significativa nos locais B, D, G e J (barras a branco na figura 8). No caso da estação de Inverno verifica-se que o local E apresentou uma percentagem de buracos vazios significativamente superior a todos os outros locais (barras a cinzento da figura 8 e tabela 7). No Verão o local D, ao contrário do que foi verificado no Outono, apresenta uma actividade alimentar significativamente elevada (barras cruzadas a cinzento na figura 8 e

tabela 7), o que se deve provavelmente à capacidade deste solo em reter, nesta estação, um conteúdo superior em água. De facto correlações positivas significativas da actividade alimentar dos organismos com o conteúdo em água do solo ($r=0,702$; $n=30$; $p<0,001$) e com a capacidade de retenção de água ($r=0,623$; $n=30$; $p<0,001$), foram registadas nesta estação. Em relação à Primavera, não foram registadas diferenças significativas quanto à actividade alimentar dos organismos edáficos entre os locais de amostragem ($p=0,150$) (Tabela 6).

Na tabela 8 estão registados os resultados da ANOVA bifactorial ($p<0,05$) efectuada para testar o efeito significativo do local e da profundidade na actividade alimentar dos organismos edáficos, após os 14 dias de exposição. Assim, e como é possível observar nesta tabela, a profundidade apenas teve um efeito significativo neste parâmetro, na Primavera ($p=0,047$), e ao contrário do que se verificou quando a análise estatística foi realizada sem ter em consideração o factor profundidade (Tabela 6), verificou-se nesta análise diferenças significativas na actividade alimentar entre locais ($p=0,016$). De facto apenas na Primavera se registou um efeito significativo da profundidade na actividade alimentar dos organismos edáficos, sendo que, duma maneira geral, nesta estação do ano a actividade alimentar foi superior nos primeiros 4cm (8 primeiros buracos) (barras a preto na figura 8).

Tabela 8 – Tabela resumo da ANOVA bifactorial efectuada para os locais e diferentes níveis de profundidade (4cm superficiais e 4 cm mais profundos), para a exposição de 14 dias. Valores significativos de $p(<0,05)$ encontram-se destacados a negrito.

Estação	Variáveis	g.l.	F	p
Outono	Local	9, 40	38,96	<0,001
	Profundidade	1, 40	0,81	0,373
	Local x Profundidade	9, 40	0,18	0,996
Inverno	Local	9, 40	15,46	<0,001
	Profundidade	1, 40	1,70	0,200
	Local x Profundidade	9, 40	0,90	0,533
Primavera	Local	9, 40	2,65	0,016
	Profundidade	1, 40	4,20	0,047
	Local x Profundidade	9, 40	0,46	0,896
Verão	Local	9, 40	8,00	<0,001
	Profundidade	1, 40	0,07	0,797
	Local x Profundidade	9, 40	1,51	0,178

DISCUSSÃO

Estudos anteriores, realizados na mina de urânio da Cunha Baixa, têm demonstrado que os solos, de alguns dos locais de amostragem seleccionados, têm a sua função de *habitat* comprometida, com base em ensaios de evitamento e reprodução com *Eisenia andrei* (A, B, C, D, F e G) e ensaios de reprodução com *Enchytraeus crypticus* (A, B, E, G e H) (Antunes et al., 2008; Niemeyer et al., submetido). Estes locais foram, de facto, os mais afectados pela actividade de exploração de minério e da lixiviação ácida *in situ* do minério pobre (A, H), através da disseminação das lamas provenientes da lagoa de tratamento do efluente (B, D e G) e por escorrências desta lagoa (F). O local E encontra-se situado perto de campos agrícolas, daí que outros agentes de stress, para além de metais podem ter algum impacto adicional neste local.

De acordo com Filzek et al. (2004), quando ocorrem mudanças na função de *habitat* do solo, é esperado que ocorram alterações na estrutura das comunidades edáficas (Filzek et al., 2004). As espécies mais sensíveis tornam-se reduzidas ou extintas, enquanto outras podem beneficiar de uma competição reduzida (Filser et al., 2008). No entanto, ainda não se sabe qual o número de espécies necessário para manter as principais funções do ecossistema (Barrios, 2007), ou mesmo se quando as espécies chave se mantêm presentes, se a poluição não diminui a sua capacidade para assegurar a manutenção dessas mesmas funções (Hobbelen et al., 2006). O fraco conhecimento sobre as relações entre a biodiversidade do solo e as suas funções justifica, *per si*, dentro de um cenário de avaliação de risco, a avaliação conjunta de dois aspectos fundamentais: i) a capacidade dos solos em actuar como *habitat* para uma grande diversidade de espécies edáficas e ii) a manutenção da capacidade de reciclar nutrientes, o que contribui para a produção de biomassa.

Os invertebrados edáficos desempenham um papel bastante importante na reciclagem de nutrientes (Bardgett e Chan 1999; Spehn et al., 2000; Cragg e Bardgett, 2001; Filzek et al., 2004; Cole et al., 2006; Barrios, 2007; Hamel et al., 2007) através da fragmentação das partículas, como consequência da actividade alimentar, reduzindo o seu tamanho, o que contribui para o aumento da área superficial, favorecendo a colonização por microrganismos e a mineralização (Cragg e Bardgett, 2001; Van Gestel et al., 2003; Filzek et al., 2004; Cole et al., 2006; Barrios, 2007). Esta actividade é de extrema importância para o ciclo de nutrientes (Filzek et al., 2004), sendo que a fauna edáfica contribui para o

aumento das taxas de mineralização no solo, contribuindo deste modo para a integridade do ecossistema terrestre através da regulação do conteúdo orgânico do solo (Bardgett e Chan 1999; Filzek et al., 2004). Assim, qualquer método capaz de medir a actividade alimentar deste grupo de organismos deve ser realizado em paralelo com os ensaios ecotoxicológicos, com vista a avaliar função de *habitat* do solo.

O ensaio de *bait-lamina*, proposto por Von Törne (1990), provou ser uma ferramenta útil para efectuar um rastreio inicial, *in situ*, dos efeitos da contaminação de solos nas suas comunidades de invertebrados (Larink et al., 1994), sendo que este é recomendado como um método para ser aplicado no esquema por etapas da análise de risco de locais contaminados (Jensen e Mesman, 2006).

No presente trabalho, o período de exposição de 7 dias mostrou ser insuficiente para discriminar locais de amostragem, uma vez que as percentagens médias de buracos vazios, e subsequente actividade alimentar dos organismos edáficos, foi bastante reduzida em todos os locais, na área de mina da Cunha Baixa. A percentagem média mais elevada (11,33%) foi registada no local I, no Outono. No entanto, durante este período de exposição, verificou-se já uma actividade alimentar significativamente superior no Outono e na Primavera. Além disso, pela análise dos dados obtidos após 7 dias de exposição, foi registada uma interacção significativa entre os locais de amostragem e as estações do ano, podendo-se concluir que as diferenças encontradas entre as estações dependem dos locais analisados, uma vez que apenas alguns deles apresentaram uma actividade alimentar ligeiramente mais elevada. No entanto, a incapacidade para discriminar diferentes locais persistiu, em todas as estações do ano. Deste modo, é possível concluir que a realização do ensaio preliminar recomendado, para seleccionar o período de exposição adequado, pode ser realizado em qualquer altura do ano, e apenas uma vez, antes de se prosseguir com o ensaio *in situ*.

O período de 14 dias de exposição foi o que melhor reflectiu a actividade alimentar dos organismos edáficos, demonstrando ser o mais adequado para a discriminação de locais de amostragem com base neste parâmetro. Este facto é consistente com o tempo mínimo de exposição proposto por outros autores para obter resultados significativos (Förster et al., 2004; Gongalsky et al., 2004). Estudos demonstraram que elevadas concentrações de metais podem ter efeitos adversos na densidade e actividade da fauna edáfica (ex. Geissen e Brümmer, 1999; Filzek et al., 2004; Lahr et al., 2008) e na

subsequente decomposição da matéria orgânica (ex. Zwoliński, 1994; Russell e Alberti, 1998; Lahr et al., 2008). Este facto foi uma vez mais demonstrado neste estudo, em que a percentagem de buracos vazios registados, e subsequente a actividade alimentar dos organismos edáficos, foi significativamente diferente entre os locais, com diferentes níveis de contaminação química, após 14 dias de exposição, excepto na Primavera. As correlações negativas significativas registadas entre a actividade alimentar e os conteúdos em metais, tais como o Cd, Ni, Mn, e o Zn, registadas na estação com actividade biológica superior (Outono), reforça o impacto negativo dos contaminantes nesta área. Além disso, devido a uma interacção significativa entre os factores local e estação do ano, este ensaio demonstrou que a discriminação dos locais de amostragem pode depender da estação do ano em que o estudo tem lugar. Assim, a realização deste ensaio nas diferentes estações do ano foi importante para perceber a influência da sazonalidade na discriminação de locais com diferentes níveis de contaminação. Deste modo, e embora a avaliação do risco de um local específico, se preocupe fundamentalmente nas diferenças espaciais entre locais, baseadas em gradientes de contaminação, pelo menos para regiões temperadas, a avaliação tem de ser realizada em diferentes estações do ano a fim de ter em conta o efeito da sazonalidade na actividade alimentar dos organismos, o que poderá confundir as conclusões extraídas do ensaio.

Os resultados do ensaio de *bait-lamina*, discriminam os locais B, D, G e J, onde a actividade alimentar dos organismos foi significativamente reduzida em praticamente todas as estações. Uma vez mais se chama a atenção para a composição dos solos dos locais B, D e G influenciados pela deposição de lamas resultantes do tratamento químico do efluente. Nestes locais foram registados os teores mais altos em metais (nomeadamente urânio, zinco, ferro, manganês, níquel, cádmio e alumínio), os valores de pH e de condutividade mais elevados e uma elevada toxicidade sub-letal para *Eisenia andrei* e *Enchytreus crypticus* (Antunes et al., 2008; Niemeyer et al., submetido). Sendo que os factores físico-químicos podem ter contribuído para a reduzida actividade alimentar dos organismos edáficos nestes locais, tal como foi demonstrado pelo registo de correlações negativas significativas. De acordo com os dados registados, o local I pode continuar a ser considerado como um potencial local de referência, para esta área, dado que exibiu uma elevada percentagem média de buracos vazios, ou seja uma elevada percentagem de actividade alimentar dos organismos edáficos. Quanto ao local J, situado a cerca de 3 Km

da mina, foi considerado como um potencial local de referência com base na caracterização química e ecotoxicológica do solo (Antunes et al., 2008; Pereira et al., 2008). Contudo, é um local com características bastante diferentes dos restantes cuja camada superficial do solo é bastante rica em matéria orgânica (folhosa). Contudo a actividade alimentar registada neste local foi bastante reduzida em todas as estações do ano, o que se pode dever ao facto de a existência de grande disponibilidade de matéria orgânica, reduzir a necessidade de os organismos edáficos utilizarem a que lhes é oferecida nas *bait-lamina*. Estudos documentam que a quantidade da matéria orgânica disponível pode influenciar a actividade alimentar dos organismos edáficos (Reinecke et al., 2002; Gongalsky et al., 2004), ao tornar as *bait-lamina* menos atractivas (Gongalsky et al., 2004). Este facto foi confirmado por Geissen et al. (2007) que descrevem a existência de uma correlação negativa entre a espessura da “camada O” do solo e a actividade alimentar dos organismos edáficos, avaliada através do ensaio de *bait-lamina*, em locais na floresta Northrhine-Westphalia na Alemanha. Da mesma forma neste estudo, uma correlação negativa significativa, ainda que não muito forte, foi registada entre o conteúdo em matéria orgânica do solo e a actividade alimentar dos organismos, pelo menos no Outono. No entanto, existem outros parâmetros que podem condicionar os resultados de um ensaio de *bait-lamina* (ex: temperatura do solo, humidade) (ex. Kula e Römboke, 1998; Larink e Sommer, 2002; Förster et al., 2004; Gongalsky et al., 2008). Neste estudo foi possível observar igualmente a influência da temperatura no local E, durante o Inverno, onde se registou um pico de temperatura ($12,22 \pm 1,6^\circ\text{C}$) e ao mesmo tempo uma percentagem significativamente superior em buracos vazios nas *bait-lamina* expostas neste local. Este local caracteriza-se por possuir pouca vegetação durante a estação do Inverno pelo que a exposição à luz solar provoca um aumento da temperatura do solo. Por outro lado, a nível de contaminação por metais este local apresentou baixo conteúdo em metais. Gongalsky et al. (2008) observaram um aumento na actividade alimentar dos organismos do solo, induzido por temperaturas de 14 e 24°C . Neste estudo, este facto foi suportado pelo registo de uma correlação positiva significativa da actividade alimentar dos invertebrados do solo com a temperatura, no Inverno.

Neste estudo foi ainda possível constatar que as características do solo podem inclusivamente mascarar o efeito dos contaminantes. Tal facto foi verificado no local D, no Verão, que ao contrário do que se verificou no Outono, foi o local que apresentou uma

actividade alimentar significativamente elevada. Esta observação deveu-se, muito provavelmente à capacidade deste solo sustentar um grande conteúdo em humidade nesta estação ($63,03 \pm 0,3\%$). Lamas resultantes dos processos de tratamento do efluente ácido da mina foram depositados neste local. Estas lamas são ricas em complexos iónicos que se formaram durante o tratamento do efluente, os quais são ricos em águas de solvatação, que podem contribuir para os elevados valores de condutividade e de conteúdo em água registados neste solo. Estudos documentam que o conteúdo em água/humidade do solo é um factor ambiental que estimula a actividade alimentar dos organismos edáficos (Spehn et al., 2000; Larink e Sommer, 2002).

Na Primavera apenas se registaram diferenças significativas na actividade alimentar dos organismos edáficos entre locais quando se teve em consideração o factor profundidade, registando-se de uma forma geral, uma maior percentagem de buracos vazios nos primeiros 4 cm de profundidade. Esta mesma tendência já foi demonstrada por outros autores (Gongalsky et al., 2004; Hamel et al., 2007). De acordo com os mesmos, diferenças na estrutura do solo, que podem ser altamente significativas em solos afectados pela actividade mineira, poderão explicar este perfil de actividade alimentar. Zwoliński (1994) descreveu também um aumento dos efeitos tóxicos dos metais, nos processos de decomposição, com a profundidade.

CONCLUSÕES

O ensaio de *bait-lamina* é efectivamente um método simples, pouco dispendioso e que dá uma perspectiva tridimensional da actividade alimentar dos invertebrados no compartimento terrestre, sendo este um parâmetro extremamente importante para inferir acerca do impacto dos diferentes agentes de stress, em uma das mais importantes funções do solo: reciclagem de nutrientes. No entanto, quando realizado *in situ*, é necessário despende algum tempo, pelo menos em regiões temperadas, a fim de integrar o efeito da sazonalidade na actividade alimentar dos organismos edáficos, em avaliação. Além disso, devido à sensibilidade do ensaio aos factores ambientais, uma vasta gama de propriedades do solo deve ser determinada em paralelo a fim de melhorar a interpretação das respostas obtidas. Como foi possível perceber, quando alguns desses factores ambientais são favoráveis, eles podem mascarar os efeitos dos contaminantes.

A actividade alimentar dos organismos edáficos, após 14 dias de exposição foi significativamente diferente entre locais seleccionados na área adjacente à mina de urânio da Cunha Baixa. Os locais B, D, G e J exibiram uma actividade alimentar significativamente reduzida, em todas as estações do ano. Os três primeiros locais estão localizados na área onde a actividade mineira teve lugar sendo caracterizados por elevadas concentrações pseudo-totais de metais, incluindo urânio. No local J, considerado como potencial local de referência, a camada de folhosa superficial do solo poderá ter sido responsável pela reduzida percentagem de buracos vazios registados nas *bait-lamina*, como foi demonstrado por uma correlação negativa significativa entre o conteúdo orgânico do solo e a actividade alimentar dos invertebrados. A preferência por detritos orgânicos locais em vez do substrato utilizado nas *bait-lamina* está bem documentada por outros autores.

Parâmetros relacionados com a decomposição de matéria orgânica devem ser integrados no âmbito da avaliação de risco de áreas contaminadas, uma vez que, esta é uma das funções mais integrativas do compartimento solo. Além disso, quando o objectivo da avaliação do risco é produzir informações científicas sólidas para apoiar a medidas de recuperação, tais como a remoção do solo contaminado ou a reflorestação, para restabelecer serviços ligados aos ecossistemas, a avaliação das funções do solo é de particular importância. O ensaio de *bait-lamina* revelou ser um método ecologicamente relevante na avaliação *in situ*. No entanto, dado que a microflora também desempenha um

papel importante na degradação da matéria orgânica, outros estudos devem ser efectuados de modo a complementar a avaliação dos impactos negativos da contaminação nas comunidades microbianas e nos processos por elas mediados.

BIBLIOGRAFIA

- Alloway B.S., 1995. Heavy metals in soils. 2nd edition, Black Academic & Professional, 368pp.
- Antunes S.C.M., 2007. Avaliação Ecotóxica Integrada da Área Adjacente a uma Mina de Urânio Abandonada. Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia, 137pág. – Tese.
- Antunes S.C., Pereira R., Gonçalves F., 2007. Acute and chronic toxicity of effluent water from and abandoned uranium mine. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 53, 207-213.
- Antunes S.C., Castro B.B., Pereira P., Gonçalves F., 2008. Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): II. Soil ecotoxicological screening. Science of the Total Environment 390, 387-395.
- Bardgett R.D., Chan K.F., 1999. Experimental evidence that soil fauna enhance nutrient mineralization and plant nutrient uptake in montane grassland ecosystems. Soil Biology and Biochemistry 31, 1007-1014.
- Barrios E., 2007. Soil biota, ecosystem services and land productivity. Ecological Economics 64, 269-285.
- Batista M.J., Relvão A.M., Schmitdt-Thomé P., Fleischhauer S.G.M., Peltonen L., 2005. Preliminary Results of a Risk Assessment Study for Uranium Contamination in Central Portugal. In: International Workshop on Environmental Contamination from Uranium Production Facilities and Their Remediation. IAEA Proceeding Series pp 17-27.
- Beck L., Römbke J., Breure A.M., Mulder C., 2005. Considerations for the use of soil ecological classification and assessment concepts in soil protection. Ecotoxicology and Environmental Safety 62, 189-200.
- Carvalho F.P., Madruga M.J., Reis M.C., Alves J.G., Oliveira J.M., Gouveia J., Silva L., 2005. Radioactive survey in former uranium mining areas of Portugal, in International Workshop on Environmental Contamination from Uranium Production Facilities and Their Remediation. IAEA Proceeding Series pp 29-40.
- Casabé N., Piola L., Fuchs J., Oneto M.L., Pamparato L., Bascak S., Giménez R., Massaro R., Papa J.C., Kesten E., 2007. Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. Journal of Soils Sediments 7, (4) 232–239.

- Chapman P.M., 1990. The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. *Science of the Total Environment* 97/98, 815-25; in Semenzin E., Critto A., Rutgers M., Marcomini A., 2008. Integration of bioavailability, ecology and ecotoxicology by tree lines of evidence into ecological risk indexes for contaminated soil assessment. *Science of the Total Environment* 389, 71-85.
- Cole L., Bradford M.A., Shaw P.J.A., Bardgett R.D, 2006. The abundance, richness and functional role of soil meso- and macrofauna in temperate grassland – A case study. *Applied Soil Ecology* 33, 186-198.
- Cragg R.G., Bardgett R.D., 2001. How changes in soil diversity and composition within a trophic group influence decomposition processes. *Soil Biology and Chemistry* 33, 2073-2081.
- Critto A., Torresan S., Semenzin E., Giove S., Mesman M., Schouten A.J., Rutgers M., Marcomini A., 2007. Development of a site-specific ecological risk assessment for contaminated sites: Part I. A multi-criteria based system for the selection of ecotoxicological test and ecological observation. *Science of the Total Environment* 379, 16-33.
- Diário da República – II Série; Ministério da Economia e do Ambiente e do Ordenamento do Território, Despacho conjunto n.º 242/2002 - Decreto-Lei nº. 198A/2001, 6 de Julho.
- Edwards C.A., 2002. Assessing the effects of environmental pollutants on soil organisms, communities, processes and ecosystems. *European Journal of Soil Biology* 38, 225-231.
- Ekschmitt K., Griffiths B.S., 1998. Soil biodiversity and its implications for ecosystem functioning in a heterogeneous and variable environment. *Applied Soil Ecology* 10, 201-215.
- Faber J.H., 2006. European experience on application of Site-specific Ecological Risk Assessment in terrestrial ecosystems. *Human and Ecological Risk Assessment*, 12, 39-50.
- Fairbridge R.W., Finkl Jr. C.W., 1979. *The Encyclopedia of soil science part1– physics, chemistry, biology, fertility, and technology*. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc..
- Falcão J.M., Carvalho F.P., Leite M.M., Alarcão M., Boavida M.G., Cordeiro E., Ribeiro J., 2004. Minas de Urânio e Seus Resíduos: Efeitos na Saúde da População – Relatório de Progresso 23 pág., MINURAR – Ficheiro PDF.

- FAON, 1984. Food and Agriculture Organization of the United Nations - Physical and Chemical Methods of Soil and Water Analysis. Soils Bull 10, 1-275.
- Filser J., Koehler H., Ruf A., Römbke J., Prinzing A., Schaefer M., 2008. Ecological theory meets ecotoxicology: challenge and chance. Basic and Applied Ecology 9, (4) 346-355.
- Filzek P.D.B., Spurgeon D.J., Broll G., Svendsen C., Hankard P.K., Parekh N., Stubberud H.E., Weeks J.M., 2004. Metal Effects on soil invertebrate feeding: measurements using the bait-lamina method. Ecotoxicology 13, 807-816.
- Förster B., Van Gestel C.A.M., Koolhaas J.E., Nentwing G., Rodrigues J.M.L., Sousa J.P., Jones S.E., Knacker T., 2004. Ring-testing and field-validation of a Terrestrial Model Ecosystem (TME) - An instrument for testing potentially harmful substances: effects of carbendazin on organic matter breakdown and soil fauna feeding activity. Ecotoxicology 13, 129-141.
- Geissen V., Brümmer V., 1999. Decomposition rates and feeding activities of soil fauna in deciduous forest soils in relation to soil chemical parameters following liming and fertilization. Biology Fertility Soils 29, 335-342.
- Geissen V., Gehrman J., Genssler L., 2007. Relationships between soil properties and feeding activity of soil fauna in acid forest soils. Journal of Plant Nutrition and Soil Science 170, 632-639.
- Gongalsky K.B., Pokarzhevskii A.D., Filimonova Z.A., Savin F.A., 2004. Stratification and dynamics of bait-lamina perforation in three forest soils along a north-south gradient in Russian. Applied Soil Ecology 25, 111-122.
- Gongalsky K.B., Persson T., Pokarzhevskii A.D., 2008. Effects of soil temperature and moisture on the feeding activity of soil animals as determined by the bait-lamina test. Applied Soil Ecology 39, 84-90.
- Gupta S.K., Vollmer M.K., Krebs R., 1996. The importance of mobile, mobilisable and pseudo total heavy metal fractions in soil for three-level risk assessment and risk management. Science of the Total Environment 178, 11-20.
- Haimi J., 2000. Decomposer animals and bioremediation of soil. Environmental Pollution 107, 233-238.

- Haimi J., Mätäsniemi L., 2002. Soil decomposer animal community in heavy metals contaminated coniferous forest with and without liming. *European Journal of Soil Biology* 38, 131-136.
- Hamel C., Schellenberg P.M., Hanson K., Wang H., 2007. Evaluation of the bait-lamina test to assess soil microfauna feeding activity in mixed grassland. *Applied Soil Biology* 36, 199-204.
- Hobbelen P.H.F., Van den Brink P.J., Hobbelen J.F., Van Gestel C.A.M., 2006. Effects of heavy metals on the structure and functioning of detritivore communities in a contaminated floodplain area. *Soil Biology and Biochemistry* 36, 1596-1607.
- Irmeler U., 1998. Spatial heterogeneity of biotic activity in the soil of a beech wood and consequences for the application of the bait-lamina test. *Pedobiologia* 42, 102-108.
- ISO, 2005. Soil Quality: Avoidance Test for Testing the Quality of Soils and the Toxicity of Chemicals- Test with Earthworms (*Eisenia fetida*). Geneva, Switzerland: International Organization for Standardization.
- Jensen J., Mesman M., 2006. Ecological Risk Assessment of Contaminated Land – Decision Support for Site Specific Investigation. ISBN 90-6960-138-9 / 978-90-6960-138-0. Documento em PDF pp136.
- Khalil H.E., Hamiani O.E., Bitton G., Ouazzani N., Boularbah, 2008. Heavy metal contamination from mining sites in south Morocco: monitoring metal content and toxicity of soil runoff and groundwater. *Environmental Monitoring Assessment* 136, 147-160.
- Knacker T., Förster B., Römbke J., Frampton G.K., 2003. Assessing the effects of plant protection products on organic matter breakdown in arable fields- litter decomposition test system. *Soil Biology and Biochemistry* 35, 1269-1287.
- Kratz W., 1998. The bait-lamina test. General aspects, applications and perspectives. *Environmental Science and Pollution Research* 5, 94-96.
- Kula C., Römbke J., 1998. Evaluation of soil ecotoxicity test with functional endpoints for Risk Assessment of Plant Protection Products - State- of – the –Art. *Environmental Science Pollution Research* 5, 55-60.
- Lahr J., Kools S.A.E., Van der Hout A., Faber J.H., 2008. Combined effects of zinc and earthworms density on soil ecosystem functioning. *Soil Biology and Biochemistry* 40, 334-341.

- Larik O., 1994. Bait-lamina as a tool for testing feeding activity of animals in contaminated soils, in Donker M.H., Elijsackers H., Heimbach F. (Eds), Ecotoxicology of soil organisms. Lewis Publishers, SETAC Special Publication Series, 470pp.
- Larink O., Sommer R., 2002. Influence of coated seeds on soil organisms tested with bait-lamina. *European Journal of Soil Biology* 38, 287-290.
- Laurence D., 2001. Classification of risk factors associated with mine closure. *Minerakl Resources Engineering* 10, (3): 315-331.
- Long E.R., Chapman P.M., 1985. A sediment quality triad: measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in puget sound. *Marine Pollution Bulletin* 16, 405-15; in Semenzin E., Critto A., Carlon C., Rugters M., Marcomini A., 2007. Development of a site-specific ecological risk assessment for contaminated sites: Part II. A multi-criteria based system for the selection of bioavailability assessment tools. *Science of the Total Environment* 379, 34-45.
- Loureiro S.P.M., 2004. Avaliação da Ecotoxicidade de Solos: Estudo do Caso das Minas de Jales, Universidade de Aveiro, Departamento de Biologia pág.174 – TESE.
- Lozano J.C., Tomé F.V., Escobar V.G., Rodríguez P.B., 2000. Radiological characterization of a uranium mine with no mining activity. *Applied Radiation and Isotope* 53, 337-343.
- Lozano J.C., Rodríguez P.B, Vera Tomé F., 2002. Distribution of long-lived radionuclides of the ²³⁸U series in the sediments of a small river in a uranium mineralization region of Spain. *Journal of Environmental Radioactivity* 63, 153-171.
- Machado M.J.C., 1998. Estudo de Impacto Ambiental em Minas Abandonadas – Comportamento dos Metais Dissolvidos nas Águas da Cunha Baixa e Quinta do Bispo. Secção de Hidroquímica – Relatório 16/H/98, Instituto Geológico e Mineiro – Ministério da Economia.
- Marques S.M., Antunes S.C., Pereira R., Gonçalves F., 2007. Efeitos subletais de uma mina de urânio abandonada (Cunha Baixa, Viseu) em *Rana perezi*. *Actas da 9ª Conferência Nacional do Ambiente*, Vol.1, pág. 279-285. Universidade de Aveiro.
- Mattson K., Angermier P.I., 2007. Integration Human impacts and ecological integrity into a risk-based protocol for conservation planning. *Environmental Management* 39, 125-138.

- McMillen S.J., Van Gestel C.A.M., Lanno R.P., Linder S.J.P., Stephenson P.G.L., 2003. Chapter 8: Biological measures of bioavailability; in Lanno P.R. (Eds), Contaminated Soils: From Soil-chemical Interactions to Ecosystem Management. A Publication of SETAC, 427pp.
- Nason G.E., Carlsen T.M., Dorn P.B., Jensen J., Norton S.B., 2003. Chapter 3: Soil-Quality Guidelines; in Lanno P.R. (Eds), Contaminated Soils From Soil-chemical Interactions to Ecosystem Management. A publication of SETAC, 427pp.
- Nero J.M.G., Dias J.M.M., Pereira A.J.S.C., Godinho M.M., Neves L.J.P.F., Barbosa S.V.T., 2003. Metodologia Integrada para Caracterização do Cenário Ambiental em Minas de Urânio Desactivadas. Actas do III Seminário de Recursos Geológicos, Ambiente e Ordenamento do Território. Vila Real, Portugal: Departamento de Geologia, UTAD.
- Neves O., Magalhães M.C.F., Matias M.J., 1997. Contribuição para o Estudo da Contaminação Resultante da Exploração e Abandono da Mina de Urânio da Cunha Baixa. I. Águas Superficiais e Subterrâneas, Actas X Semana de Geoquímica / IV Congresso de Geoquímica dos Países de Língua Portuguesa Braga, Portugal, 483-486.
- Neves M.O., Matias M.J., Abreu M.M., Magalhães M.C.F., Bastos M.J., 2005. Abandoned Mine Site Characterization from Remediation: The Case of the Cunha Baixa Uranium Mine (Viseu, Portugal). In: International Workshop on Environmental Contamination from Uranium Production Facilities and Their Remediation. IAEA Proceeding Series 159-169 pp.
- Neves O., Matias M.J., 2008. Assessment of groundwater quality and contamination problems ascribed to an abandoned uranium mine (Cunha Baixa Region, Central Portugal). Environmental Geology 53, 1799-1810.
- Niemeyer J.C., Pereira R., Gonçalves F., Sousa J.P. Evaluation of Mine Soils From an abandoned Uranium Mine Area using a Battery of Reproduction Tests. *Submetido a revista internacional.*
- O'Halloran K., 2006, Toxicological considerations of contaminants in the terrestrial environment for Ecological Risk Assessment. Human and Ecological Risk Assessment 12, 74-83.

- Oliveira J.M.S., 1997. Algumas Reflexões com Enfoque na Problemática dos Riscos Ambientais associados à actividade mineira. Estudos, Notas e Trabalhos, Tomo 39, Instituto Geológico e Mineiro.
- Oliveira J.M.S., Ávila P.F., 1998. Estudo Geoquímico na Área da Mina da Cunha Baixa (Mangualde, no Centro de Portugal), Relatório do Instituto Geológico e Mineiro, 57 páginas.
- Oliveira J.M.S., Ávila P.M., 2001. Geoquímica na Área Envolvente da Mina de Urânio da Cunha Baixa (Mangualde, no Centro de Portugal). Estudos, Notas e Trabalhos, Tomo 43, Instituto Geológico e Mineiro.
- Pedrosa M.Y., Martins H.M.L., 1999. Estudo do Impacto Ambiental em Minas Abandonadas - Hidrologia da Mina da Cunha Baixa (Estudo Preliminar), Direcção Geral do Ambiente (DGA) e Instituto Geológico e Mineiro (IGM) Protocolo nº17/95, p.48.
- Peijnenburg W.J.G.M., 2002. Bioavailability of metals to soil Invertebrates- Chapter 5 – In Bioavailability of Metals in Allen, H.E. (Eds), Terrestrial Ecosystems: Importance of Partitioning to Invertebrates, Microbes, and Plants. A Publication of SETAC, 158pp.
- Peplow D., Edmonds R., 2005. The effects of mine waste contamination at multiple levels of biological organisation. Ecological Engineering 24, 101–119.
- Pereira R., Ribeiro R., Gonçalves F., 2004a. Plan for an integrated Human and environmental risk assessment in the S. Domingos mine area (Portugal). Human and Ecological Risk Assessment 10, 543-578.
- Pereira A.J.S.C., Neves L.J.P.F., Dias J.M.M., Barbosa S.V.T., 2004b. Evaluation of Radionuclide Contamination the Vicinity of the Cunha Baixa and Quinta do Bispo old Uranium Mines (Central Portugal). Radioproteção, Vol. 2, nº4/5.
- Pereira R., Sousa J.P., Ribeiro R., Gonçalves F., 2006. Microbial indicators in mine soils (S. Domingos, Portugal). Soil & Sediment Contamination 15, 147-167.
- Pereira R., Antunes S.C., Marques S.M., Gonçalves F., 2008. Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): I. Soil chemical characterization. Science of the Total Environment 390, 377-386.
- Reinecke A.J., Helling B., Louw K., Fourie J., Reinecke A.S., 2002. The impact of different herbicides and cover crops on soil biological activity in Vineyards in the Western Cape, South Africa. Pedobiologia 46, 475-484.

- Riuter P.C., Griffiths B., Moore J.C., 2002. Chapter 9 – Biodiversity and Stability in Soil Ecosystems: Patterns, Processes and the Effects of Disturbance, in Loreau M., Naeem S. Inchausti P. (Eds), *Biodiversity and Ecosystem Functioning: Synthesis and Perspectives*. Edited by Oxford Biology, 1st Edition, 294pp.
- Römbke J., Breure A.M., 2005. Status and outlook of ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 300-308.
- Römbke J., Breure A.M., Mulder C., Rutgers M., 2005. Legislation and ecological quality assessment of soil: Implementation of ecological indication system in Europe. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 201-210.
- Russell D.J., Alberti G., 1998. Effects of long-term, geogenic heavy metal contamination on soil organic matter and microarthropod communities, in particular collembolan. *Applied Soil Biology* 9, 483-488.
- Salomons W., 1995. Environmental impact of metal derived from mining activities: Processes, predictions, prevention. *Journal of Geochemical Exploration* 52, 5-23.
- Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment (CSTEE) - Opinion on: The Available Scientific Approaches to Assess the Potential Effects and Risk of Chemicals on Terrestrial Ecosystems; Opinion Expressed at the 19th CSTEE Plenary Meeting, Brussels, 9 November 2000 – European Commission Directorate-General Health and Consumer Protection Brussels - Ficheiro PDF.
- Semenzin E., Critto A., Carlon C., Rutgers M., Marcomini A., 2007. Development of a Site-specific ecological risk assessment for contaminated sites: Part II. A Multi-criteria based system for the selection of bioavailability assessment tools. *Science of the Total Environment* 379, 34-45.
- Semenzin E., Critto A., Rutgers M., Marcomini A., 2008. Integration of bioavailability, ecology and ecotoxicology by tree lines of evidence into ecological risk indexes for contaminated soil assessment. *Science of the Total Environment* 389, 71-85.
- SPAC, 2000. Soil and Plant Analysis Council – Handbook of Reference Methods. Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Spehn, E.M., Joshi J., Schmid B., Alphei J., Körner C., 2000. Plant diversity on soil heterotrophic activity in experimental grassland ecosystem. *Plant and Soil* 224, 217-230.

- Vandenhove H., Van Hees M., Wouters K., Wannijn J., 2007. Can we predict uranium bioavailability based on soil parameters? Part1: Effect of soil parameters on soil solution uranium concentration. *Environmental Pollution* 145, 587-95.
- Van Gestel C.A.M., Kruidenier M., Berg M.P., 2003. Suitability of wheat straw decomposition, cotton strip degradation and bait-lamina test to determine soil invertebrate activity. *Biology Fertility Soils* 37, 115-123.
- Van Straalen N.M., Van Gestel C.A.M., 1993. Chapter 13: Soil Invertebrates and Micro-organisms, In Calow P. (Eds), *Handbook of Ecotoxicology*, Volume One, 1st Edition, Blackwell Scientific Publications, 478pp.
- Van Straalen N.M., 2002. Assessment of soil contamination - A functional perspective. *Biodegradation* 13, 41-52.
- Von Törne E., 1990. Assessing feeding activities of soil living animals, I Bait-lamina Test. *Pedobiologia* 34, 89-101.
- Weeks J.M., Sorokin N., Johnson I.J., Whitehouse P., Ashton D., Spurgeon D., Hankard P., Svendsen C., Hart A., 2004. Biological Test Methods for Assessing Contaminated Land, Stage 2 – A demonstration of the Use of a Framework for the Ecological Risk Assessment of Land Contamination, Environmental Agency Science Report P5-069/TR1.
- Weeks J.M., Comber S.D.W., 2005. Ecological Risk Assessment of Contaminated Soil. *Mineralogical Magazine* 69, (5) 601-613.
- Wentzel R.S., Beyer W.N., Edwards C.A., Kapustka L.A., Kuperman R.G., 2003. Chapter 4: Effects of Contaminants on Soil Ecosystem Structure and Function, in Lanno P.R. (Eds), *Contaminated Soils: From Soil-chemical Interactions to Ecosystem Management*. A publication of SETAC, 427pp.
- www.terra-protecta.de/englisch/ks-info-en-htm.
- Zar J.H., 1996. *Biostatistical Analysis*, 4th Edition, Prentice-Hall International, New Jersey, USA 663pp.
- Zwoliński J., 1994. Rates of organic matter decomposition in forest polluted with heavy metals. *Ecological Engineering* 3, 17-26.